ROMANIAN ACADEMY

Institute of Cellular Biology and Pathology

„NICOLAE SIMIONESCU”

THESIS
-Book summary-

FUNCTIONAL AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF MEMBRANE MICRODOMAINS IN NORMAL STATE AND PATHOLOGY
(diabetes, hypercholesterolemia, atherosclerosis)

Coordinator
Ph. Antohe Felicia

PhD Student
Elena Uyy

BUCHAREST
2012

CONTENTS

PART I - STATE OF KNOWLEDGE ON MEMBRANE MICRODOMAINS

I.1. Plasma membrane and lipid microdomains

I.2. The caveolae as highly specialized membrane microdomains..... 7

I.2.1. Introduction ……..……...… 10
I.2.2. Caveolae and their involvement in cardiovascular physiology ……..… 16

I.3. Caveolae in endothelial cell …...……..... 17

I.3.1. Introduction……...……...…… 17
I.3.2. Caveolae involvement in the regulation of vascular permeability..……..... 19
I.3.3. Role of caveolae / caveolins in plasma macromolecules transport and homeostasis……... 26
I.3.4 Caveolin-1 and angiogenesis ……... 29

I.4. Caveolae and endothelial cell dysfunction……...……. 30

I.4.1 Introduction..... 30

I.4.2 Endothelial cell dysfunction in cardiovascular diseases and role of caveolae in:……... 31
I.4.2.1. diabetes…… 36
I.4.2.2. hypercholesterolemia / atherosclerosis ……... 42
I.4.2.3. arterial hypertension……..…….. 49
I.4.2.4. cancer……..……. 58

I.5. Receptors and signaling pathways involved in the relationship between caveolae / caveolins and endothelial cell dysfunction ……. 61

I.5.1. Caveolae associated receptors ……...……...…….. 61
I.5.2. Signaling pathways …….……... 63
I.5.3. Role of caveolae in Ca^{2+} mobilization mechanisms……..…… 65
I.5.4. Caveolae, folate receptor, receptor clustering and potocytosis …….…. 66
I.5.5. Therapeutic potential of folate conjugates ……..……... 67
I.6. Conclusions……..... 69

PART II - ORIGINAL CONTRIBUTIONS

II.1. Introduction and objectives …….……..... 71

II.2. Experimental methodology ……... 73

II.2.1. Experimental design……...…… 73
II.2.2 Microscopy techniques ……... 75
II.2.2.1. Electron microscopy and morphometric analysis ……...…..…… 75
II.2.2.2. Optical microscopy ……...……..….. 75
II.2.3. Preparation of cytoplasmic, nuclear and membrane protein extracts …..……. 76
II.2.4. Preparation of membrane domains enriched in caveolin-1 by sucrose gradient ultracentrifugation …….. 77
II.2.5. Western Blotting …….…... 77

II.2.6. ELISA……..…..….. 78
II.2.7. ARN isolation and RT-qPCR……..…….. 78
II.2.8. LC-MS/MS……..……...… 79
II.2.9. Statistical analysis ……..… 79
II.3. Experimental studies …….…… 80
II.3.1 Caveolin-1 is associated with structural changes of pulmonary endothelial cells in diabetes ……..... 80
II.3.1.1. Introduction …….…….. 80
II.3.1.2. Experimental design ……..…… 81
II.3.1.3. Results and discussion ……... 82
II.3.1.3.1. Characterization of experimental models ……. 82
II.3.1.3.2. Structural changes of pulmonary endothelial cells in diabetes ……..…… 82
II.3.1.3.3.Biochemical characterization of Caveolin-1 enriched membrane microdomains (ACE activity, cholesterol level, total protein)……... 85
II.3.1.3.4. Caveolin-1 and -2 protein over-expression in diabetes 88
II.3.1.3.5. Caveolin-1 gene up-regulation in diabetes ……... 91
II.3.1.4. Conclusions……...…. 93
II.3.2. Protein expression of heat shock proteins (HSP) and other " lipid raft" proteins in experimental hyperlipidemia ……..... 95
II.3.2.1. Introduction……...……...……... 95
II.3.2.2. Experimental design ……..……...…….. 97
II.3.2.3. Results and discussion ……. 97
II.3.2.3.1. Hyperlipidemic diet induced atherosclerotic plaque progression …….. 97
II.3.2.3.2. Structural changes of lung endothelial cells in hyperlipidemia... 101
II.3.2.3.3. Characterization of caveolin-1 enriched membrane microdomains 102
II.3.2.3.4. Characterization of cytosolic / nuclear / membrane protein fractions ……...…… 106
II.3.2.3.5. Hyperlipidemia induces the up-regulation of caveolin-1 protein in "lipid rafts”…….…….. 108
II.3.2.3.6. Caveolin-1 gene expression in atherosclerosis ….…….. 109
II.3.2.3.7. Atherosclerosis induces the down-regulation of PTRF protein expression in "lipid rafts" enriched in caveolin-1 ..……. 110
II.3.2.3.8. Atherosclerosis induces the protein up-regulation of RAGE co-fractionated with caveolin-1 and the activation of AKT signal pathway … 111
II.3.2.3.9. Folate receptor protein up-regulation in lung endothelium in atherosclerosis ……..……..... 114
II.3.2.3.10. Up-regulation of the proteins involved in dynamin mediated endocytosis that co-fractionate with caveolin-1 (dynamin, filamin A, clathrin)…… 115
II.3.2.3.11.Correlation of serum heat shock proteins released and their

location in membrane caveolin-1 enriched fractions in hyperlipidemia….. 118
II.3.2.4. Conclusions……..…….... 121

II.3.3. Increased uptake of folate conjugates by activated macrophages in experimental hyperlipemia ……..……. 125

II.3.3.1. Introduction……..…….. 125
II.3.3.2. Experimental design ……...…...… 127
II.3.3.3. Experimental procedures……...……. 127
II.3.3.3.1. The preparation of tissue cryosections with atherosclerotic lesions …… 128
II.3.3.3.2. The uptake of folate-Texas Red in cultured peritoneal macrophages **…**…….……..... 129
II.3.3.3. The uptake of folate- FITC/Texas Red by the U937 monocytes..… 129
II.3.3.4. Results and discussion ……..……..... 130
II.3.3.4.1. The specific uptake of folate-Texas Red in cultured peritoneal macrophages …..…… 130
II.3.3.4.2. The uptake of folic acid by atheroma plaque associated cells..... 133
II.3.3.4.3. The specific uptake of folic acid-FITC/Texas Red by the U937 cell line ……..……..…... 135
II.3.3.5. Conclusion…..…… 137

II.4. General conclusions…….……...… 139

II.5. Bibliography……..……..…… 143

II.6. List of published and communicated scientific papers ….…….. 161

KEYWORDS

Endothelial cells,
"Lipid Raft"
Caveolin-1,
PTRF,
Folate receptor
Diabetes,
Hyperlipidemia,
Atherosclerosis,

PART I

STATE OF KNOWLEDGE ON MEMBRANE MICRODOMAINS

The "fluid mosaic" model of cell membranes structure (as well as endomembranes) is based on a heterogeneous, asymmetric, two-dimensionally organized lipid fluid bilayer. The bilayer contains proteins which give it a mosaic feature (proteins are floating, or are immersed in a lipid sea), membrane associated cytoskeleton (a structure located on the internal face of the membrane) and the glicocalyx (a structure exposed on the outer surface of membranes, made of olygo-(poly)-saccharide chains of glycolipids, glycoproteins and proteoglycans).

In addition to the "fluid mosaic" model, in terms of structure and function there are defined notions of membrane domains and / or microdomains. Microdomains composition and existence (caveolae, "lipid rafts", clathrin coated structures) have a dynamic nature that responds to the ever changing need of the cells, imposed by internal biochemical activities, or by external stimuli. Membrane components such as lipids, proteins or carbohydrates present both structural and metabolic roles. This duality of roles is valid for both classes of biochemical membrane components and molecular entities (same molecule can perform both structural and metabolic functions) (Pike et al, 2009).

Significant progress has been achieved in molecular and cellular biology in 2009 when Pike and his collaborators have formulated several questions whose answer is sought even in the present. In short the questions address the following mechanisms: 1) How the membrane protein level is modifying in response to stimuli coming from the environment that affect the composition and behavior of the "lipid rafts"?, 2) What are the physiological functions of the "lipid rafts"?, 3) How the continuous flow of membrane lipids, coming from/to the plasma membrane to/from the internal compartments, is performed , 4) How does this flow affect the domain formation and how can diet or drug therapy modify the lipid composition by altering lipid domains function?

PART II
ORIGINAL CONTRIBUTIONS

Experiments performed *in vitro* on membrane systems such as the *black hole* model do not explain all the complex functions of intact cells. In this context, *in vivo* experiments were carried out for a better understanding of membrane microdomains pathophysiology. Our data showed that:

In insulin-dependent diabetes, endothelial cells express a high number of caveolae, exposing a greater luminal surface and a well developed inner biosynthetic membrane complex. These changes correlate with increased ACE activity, cholesterol level and caveolin-1 expression which indicates an EC response to the induced stress by elevated serum glucose and serum lipid levels (Uyy et al., 2010)

Association of hyperlipidemia diet with type I diabetes emphasizes stress effects in lung tissue.

Increased cholesterol in plasma membrane induced by type I diabetes and / or hyperlipidemia diet demonstrated an enrichment of the cell membrane with "lipid rafts" with a modified biochemical composition which significantly affects fluidity and permeability of the cell membrane (Uyy et al., 2010, Uyy et al., in press 2012).

In the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus, increased expression of caveolin-1, cholesterol concentration and increased ACE enzymatic activity may cause inhibition of eNOS located on the internal face of the membrane, followed by reduced production of NO, which ultimately lead to the emergence dysfunction of endothelial cells (Uyy et al., 2010)

The results obtained have a high potential to be used in practical applcations through simultaneously targeting molecules as ACE and caveolin-1, on endothelial cells surface affected by hyperglycemia and hyperlipidemia, a valuable mechanism which could be a further therapeutic strategy in diabetes mellitus type I (Uyy et al., 2010).

Experimental models designed using a hyperlipidemic diet on Golden Syrian hamsters and APO E *knockout* mice have demonstrated the development of atherosclerotic lesions and installation of the pathology accompanied by significant changes in the endothelial cell ultrastructure and function (Haraba, Uyy et al., 2011, 2011, Uyy et al., in press 2012)

Hyperlipidemic diet induced changes in the expression of membrane proteins involved in transport vesicle fission, that co-fractionate with caveolin-1. These results support the

concept of membrane associated caveolae rapid disassembly as endothelial cell response to stress hyperlipidemia and also redistribution of caveolin-1 in non-caveolae "lipid rafts" at the plasmalemma level or intracellular membranes (PTRF and dynamin protein down-regulation and caveolin -1 and filamin A protein up-regulation) (Uyy et al., in press 2012).

The changes induced by hyperlipidemic diet in the expression of proteins that co-fractionated with caveolin-1 involved in transport vesicle fission (PTRF, dinamin, clathrin and filamin A) may be an indirect response of increased internalization of macromolecules by dinamin dependent clathrin mediated endocytosis at the expense of the caveolar one in pathological conditions induced by atherosclerosis in pulmonary microvasculature (Uyy et al., in press 2012).

The onset of atherosclerosis induced an increase of RAGE and folate receptors (FR) expression that co-fractionate with caveolin-1 in pulmonary endothelial membrane by activating AKT signaling pathway. These mechanisms maintain and amplify the inflammatory processes in the lung tissue (Haraba, Uyy et al., 2011, 2011).

Statin therapy significantly decreases the tendency of folate receptor and RAGE to accumulate in the membrane fractions isolated from endothelium lung and attenuates the AKT signaling pathway activation and inflammation associated with atherosclerosis.

Caveolae disassembly induced by hyperlipidemia and by redistribution of caveolin-1 in non-caveolae "lipid rafts" doesn’t appear to influence the expression of the two proteins (RAGE and FR) in caveolin-1 positive membrane fractions enriched in "lipid rafts" but can be correlated with increased expression of caveolin-1 protein.

Atherosclerosis induces an over-expression of HSP 70 and a down- regulation of HSP 90 that co-fractionate with caveolin-1 in membrane fractions isolated from lung tissue (Uyy et al., in press 2012).

The statin therapy reversed significantly the hyperlipidemia induced changes by reducing the serum secretion of HSP 60 and 70 and by increasing the secretion and co-fractionation of HSP 90 with caveolin-1 (Uyy et al., in press 2012).

The hyperlipidemic condition induced a change in the protein expression of HSP 70 and HSP 90 that co-fractionate with caveolin-1 in membrane fractions which correlated with the protein expression of HSP 70 and HSP 90, secreted in serum isolated from the same experimental group, which leads us to hypothesize the involvement of caveolin-1-positive "lipid rafts" in their secretion (Uyy et al., in press 2012).

Because the experimental models used presented similarities with the human pathology, the data obtained may be relevant to the modulation of molecular processes in patients with type I diabetes and / or atherosclerosis.

The quantitative (spectrofluorimetric) and qualitative (fluorescence microscopy) analysis revealed a significant increase in the retention of folate - conjugates by peritoneal macrophages harvested from the hyperlipidemic hamsters as opposed to the animals which were maintained on either normal (high folate) or folic acid deficient diet (Antohe, Puchianu et al. 2005).

Histological analysis confirmed the prevalent uptake of folate conjugate by atherosclerotic plaques populated by macrophages, compared with the distal regions which presented a low fluorescence level (Antohe, Puchianu et al. 2005)

The experiments performed on U937 macrophages in culture using hyperlipidemic medium confirmed the results obtained *in vivo* (Antohe, Puchianu et al. 2005)

Increased folate uptake by U937 macrophages can be explained by the increased expression of the folate receptors (FR) on activated macrophages. This increase of FR expression can be exploited in folic acid compounds targeted therapies by using various drugs directed to activate macrophage rich atherosclerotic lesions (Antohe, Puchianu et al. 2005)

The concept of membrane microdomains used to explaine the endothelial cell dysfunction in various diseases is a very modern and common subject. In this regard, their protein content characterization and the therapeutic opportunities offered by the lipid membrane microdomains could expand the arsenal of treatment options in cardiopulmonary diseases.

Bibliography

Elena Uyy, Felicia Antohe, Luminita Ivan, Raluca Haraba, Dorel Lucian Radu, Maya Simionescu, Upregulation of caveolina-1 expression is associated with structural modifications of endothelial cells în diabetic lung, Microvascular Research, 79, 154-159, 2010.

Elena Uyy, Luminita Ivan, Raluca Boteanu, Viorel Suica and Felicia Antohe, Heat Shock Proteins and Membrane Caveolins Overexpression în Experimental Hyperlipidemia trimisa spre publicare la Biology of the cell (FI 4,898)

Felicia Antohe, Luminita Radulescu, Elena Puchianu, Michael D. Kennedy, Philip Low, Maya Simionescu - Increased uptake of folate conjugates by activated macrophages în experimental hyperlipemia, Cell Tissue Res., 320(2):277-285, 2005. (FI 2,991)

Pike L. J., The challenge of lipid „raft”s, Journal of Lipid Research, 2009, 50:S323-328

Raluca Haraba, Elena Uyy, Viorel I. Suica, Luminita Ivan, Felicia Antohe - Fluvastatin reduces the high mobility group box 1 protein expression în hyperlipidemia, International Journal of Cardiology, Jul 1;150(1):105-7, 2011, (FI 7,078)

Raluca Haraba, Viorel I. Suica, Elena Uyy, Luminita Ivan, Felicia Antohe, Hyperlipidemia stimulates the extracellular release of nuclear high mobility group box 1 protein, Cell Tissue Res. Dec; 346 (3) : 361-8. 2011 (FI 3,114)

Académie Roumaine

Institut de Biologie et Pathologie Cellulaire „Nicolae Simionescu”

THÈSE DE DOCTORAT

ÉTUDE DE LA PLATICITÉ DES CELLULES SOUCHES FŒTALES AYANT UN POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE

Coordinateur scientifique:

Acad. Maya Simionescu

Doctorant:

Andrei Constantinescu

Bucarest, 2013

CONTENU

I. INTRODUCTION

II. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

Chapitre 1. Les cellules souches et une thérapie cellulaire

1.1. Les cellules souches

1.1.a. Les cellules souches classification

1.1.b. Le rôle des cellules souches

1.1.c. L'importance de cellules souches

1.2. Les cellules souches differetiation

1.1.a. Les cellules souches totipotentes

1.1.b. Les cellules souches pluripotentes

1.1.c. Les cellules souches hématopoïétiques

1.1.d. Les cellules souches mésenchymateuses

1.1.e. Oligopotent cellules souches

1.1.f. Les cellules souches unipotentes

1.1.g. Cellules avec la pluripotence induite

Chapitre 2. Les cellules souches sources

2.1. Les cellules souches embryonnaires

2.2. Cellules souches fœtales

2.3. Les cellules souches adultes

Chapitre 3. L'utilisation de cellules souches

3.1. Les cellules souches de la recherche fondamentale

3.2. Les cellules souches dans la recherche pharmacologique

3.3. Applications thérapeutiques des cellules souches

III. CONTRIBUTION D'ORIGINE

Chapitre 1. Évaluation du potentiel de recelluarization vasculaire de la tige du fœtus isolé de gelée de Wharton

1.1. Introduction

1.2. Objectifs

1.3. Méthodologie et résultats

1.3.1. L'isolement et la caractérisation des cellules souches de gelée de Wharton

1.3.1.a. Isolement de cellules souches

1.3.1.b. Immunophénotypage de cellules souches

1.3.2. La différenciation et la caractérisation des cellules souches de gelée de Wharton

1.3.2.a. Différenciation endothéliale de cellules souches mésenchymateuses

1.3.2.b. Immunophénotypage des cellules progénitrices endothéliales
1.3.3. L'isolement et le traitement des artères du cordon ombilical
1.3.3.a. Isolement des artères
1.3.3.b. Décellularisation des artères
1.3.4. Évaluation du potentiel de recellularization vasculaire
1.3.4.a. L'obtention de tissus cellules-vasculaire co-cultures
1.3.4.b. L'analyse histologique
1.3.4.c. Analyse par microscopie de fluorescence
1.3.4.d. L'évaluation de immunophénotype
1.4. Discussions and conclusions
Chapter 2. Characterization and evaluation of the therapeutic potential of amniotic fluid cells
2.1. Introduction
2.2. Objectifs
2.3. Méthodologie et résultats
2.3.1. Caractérisation des cellules du liquide amniotique
2.3.1.a. Caractérisation morphologique
2.3.1.b. L'analyse ultrastructurale
2.3.1.c. Cellules mezenchymal immunophénotypage
2.3.1.d. Cellules mezenchymal profil transcriptimic
2.3.2. Différenciation des cellules du liquide amniotique
2.3.2.a. Différenciation endothéliale
2.3.2.b. Les cellules endothéliales analyse ultrastructurale
2.3.2.c. Les cellules endothéliales immunophénotypage
2.3.3. Cellules positives CD117 tri du liquide amniotique
2.3.3.a. La cytométrie de flux de tri de cellules
2.3.3.b. Cellules positives pour CD117 analyse morphologique
2.3.3.c. Analyse de immunophénotype des cellules triées
2.4. Discussions et conclusions
IV. CONCLUSIONS GÉNÉRALES
V. PERSPECTIVES
VI. RÉFÉRECES

MOTS-CLÉS

Cellules souches fœtales

Les cellules souches mésenchymateuses

Gelée de Wharton

Le liquide amniotique

Tissu vasculaire fœtal humain

Différenciation cellulaire

Des cellules progénitrices endothéliales

Eecellularization vasculaire

La cytométrie de flux

Tri cellulaire

RÉSUMÉ

L'objectif de cette thèse est l'étude de la plasticité des cellules souches mésenchymateuses à partir de sources fœtus et d'évaluer le potentiel thérapeutique des cellules souches fœtales et leurs implications dans la médecine régénérative. Ainsi, nous avons voulu étudier la capacité de différenciation de cellules mésenchymateuses isolées à partir de la gelée de Wharton en cellules progénitrices endothéliales et pour évaluer le potentiel de régénération du tissu cardiovasculaire de celui-ci. À cette fin, nous avons l'intention d'établir un modèle in vitro basé sur le tissu vasculaire fœtal humain des artères du cordon ombilical d'étudier le potentiel des cellules progénitrices endothéliales recellularisation cellules souches mésenchymateuses foetales différentiables.

En outre, nous voulions étudier la plasticité des cellules souches mésenchymateuses à partir de liquide amniotique par l'analyse approfondie de leur capacité à se différencier en cellules progénitrices endothéliales pour évaluer le potentiel thérapeutique. À cette fin, nous avons voulu étudier à la fois immunophénotypique et le profil transcriptomique des cellules mésenchymateuses du liquide amniotique mais aussi cellules endothéliales détails ultrastructuraux différenciées des cellules mésenchymateuses de liquide amniotique.

La thèse est divisée en deux parties. Dans la première partie, l'état actuel des connaissances, est organisé en trois chapitres qui décrivent les aspects de cellules souches (chapitre 1 de l'étude actuelle de la connaissance) et la hiérarchie des cellules souches et de leur rôle (chapitre 1.1 de l'étude actuelle de la connaissance) et la capacité de faire la distinction (chapitre 1.2 de l'étude actuelle de la connaissance). Voici une description des types de cellules en fonction de la source d'où ils sont issus et un aperçu des méthodes d'isolement (chapitre 2 de l'étude actuelle de la connaissance), et le dernier chapitre est détaillé en utilisant des cellules souches à la fois dans la recherche fondamentale et dans la recherche pharmacologique et la médecine régénérative (chapitre 3 de l'étude actuelle de la connaissance).

Dans la deuxième partie de la thèse, contribution originale, les études ont été divisés en deux chapitres. Afin d'évaluer le potentiel de recellularisation vasculaire cellules souches fœtales isolées à partir de la gelée de Wharton (chapitre 1 de la contribution d'origine) J'ai regardé l'isolement, la caractérisation et diferetierea Wharton cellules mésenchymateuses de la gelée de la ligne de endothéliale et d'établir un modèle in vitro sur la base de foetus humain tissus vasculaires des artères du cordon ombilical. Nous avons donc voulu étudier le potentiel

des cellules progénitrices endothéliales recellularisation tant au niveau histologique et immunophénotypique.

Les résultats obtenus démontrent la capacité des cellules souches mésenchymateuses dans la gelée de Wharton se différencier des cellules endothéliales progenitoarea terapetutic avec un potentiel réel de la régénération vasculaire. Ces cellules pourraient avoir un impact majeur sur la médecine régénérative raison de la faible immunogénicité et terpeutic potentiel.

Dans l'étude regading l'évaluation du potentiel thérapeutique des cellules du liquide amniotique (chapitre 2 de la contribution d'origine), nous avons cherché à obtenir une caractérisation complète de ces cellules à immunophénotypique, ultrastructurale et moléculaire. À cette fin, nous avons utilisé la cytométrie en flux pour enquêter sur la microscopie électronique à surface Maker et technique de PCR en temps réel (section 2.3.1 de la contribution d'origine). Dans le même temps, nous avons voulu évaluer le potentiel de différenciation des cellules du liquide amniotique par induction de la différenciation des cellules endothéliales (chapitre 2.3.2 de la contribution d'origine). Aussi, je regardais la détermination des cellules souches phénotype CD117 de liquide amniotique par tri positif et analyse immunophénotypique de cultures cellulaires provenant CD117 positif (chapitre 2.3.3 de la contribution d'origine).

Les résultats démontrent la capacité des cellules de liquide amniotique à se différencier en cellules endotheliales matures en présence de marqueurs de surface spécifiques de ces cellules, et en ce structures intracellulaires spécifiques, telles que des vésicules, Weibel-Palade plasmalemme et corpuscules. En outre, nous avons observé des différences immunophénotype des cellules positives CD117 dans hétérogène liquide de la population cellulaire à établir des relations positives entre les cellules CD117 et CD117 négatives sein d'une population hétérogène.

En conclusion, en ce qui concerne le potentiel de régénération des cellules isolées de la gelée de Wharton, nos résultats ont démontré que les artères décellularisées de cordon ombilical humain peut être utilisé comme une matrice acellulaire et est un bon modèle expérimental in vitro. Nous avons démontré que les PEC différenciées à partir des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton peuvent repeupler le tissu vasculaire endommagé / decellularised en témoigne l'expression du phénotype endothélial de marqueurs spécifiques CD31 + / CD34 + / CD105 + / CD133 + artères recelularizate. Les données obtenues histologie et coulent suggère cytométrie que les PEC différenciées à partir de cellules souches mésenchymateuses d'origine foetale sont intalt potentiel thérapeutique grâce à leur capacité de repeupler les vaisseaux sanguins endommagés / greffes.

En ce qui concerne les cellules isolées à partir de liquide amniotique , on en conclure que ces cellules ont un immunophénotype spécifique du spécifique des cellules souches mésenchymateuses , en exprimant les marqueurs CD29 , CD90 et CD73 . Immunophénotype CD29 + / CD90 + / CD105 + / CD133 + / CD146 + de ces cellules suggère la présence de marqueurs spécifiques et d'autres types cellulaires telles que les cellules endothéliales et CD133 CD105 spécifique à la surface des cellules souches hématopoïétiques et les cellules progénitrices endothéliales. En dépit de la très grande capacité de prolifération des cellules dans le liquide amniotique , leurs changements immunophénotypiques après 10 jours de culture , et sont devenus CD29 + / + CD90-/CD105-/CD133-/CD146 . Sur les sites de l'AFC au niveau moléculaire montre les deux marqueurs de cellules souches mésenchymateuses tels que PAC, BGLAP , COL2A1 et PPARG , et souches marqueurs transcriptomiques spécifiques de cellules embryonnaires tels que OCT4 , REX1 SOX2 ou . Intéressant de noter la présence de marqueurs spécifiques telles que les cellules souches hématopoïétiques CD3D , CD4 , CD8a ou MME et marqueurs spécifiques des cellules souches neurales telles que NCAM1 , SIGMAR1 et S100B . Ces résultats nous conduisent à l'hypothèse de la présence d' un nombre limité de marqueurs spécifiques de toutes les lignées cellulaires à partir de cellules souches . Ce phénomène pourrait être corrélé avec un potentiel de différenciation que des réponses à des stimuli externes par l'existence de molécules " amorce " qui mènent la différenciation par des stimuli appliqués.

En outre, l'AFC présenter la capacité de différenciation en ligne et endothéliales. Ces cellules peuvent se différencier en maturité endothéliale immunophénotype de cellule spécifique comme cela a été démontré par cytométrie en flux, marqueurs endothéliaux CD31 cela, CD105 et CD144. Une nouveauté importante est l'analyse ultrastructurale de sites AFC différenciées qui a démontré la présence de structures de cellules endotheliales spécifiques tels que les vésicules intracellulaires, Weibel-Palade plasmalemme et corpuscules. Ainsi, ces cellules non seulement avoir la possibilité d'être guidé par ligne endothéliale, il peut même être des structures nécessaires à maturité des cellules endothéliales de la performance possible de leurs fonctions, telles que, par exemple, des vésicules de plasmalemme qui peuvent être impliqués dans le processus de transcytose.

Comme perspectives pour l'avenir, nous voulons étudier la capacité des cellules du liquide amniotique pour repeupler vaisseaux sanguins endommagés / greffes. En outre, nous proposons d'utiliser des cellules souches dans la co-culture de CD117 cellules progénitrices endothéliales positifs isolés à partir de sang de cordon pour enquêter sur la puissance

réparatrice de casse-cou sans utilisation de facteurs de croissance et de la différenciation in vitro de soutenir une stratégie thérapeutique possible de l'applicabilité clinique.

I'ACADÉMIE ROUMAINE
INSTITUT DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PATHOLOGIE
"NICOLAE SIMIONESCU"

THÈSE
-RÉSUMÉ DU LIVRE-

La participation des protéines tyrosine phosphatases (PTP) dans la signalisation intracellulaire

Coordinateur:
Acad. Maya Simionescu

Doctorant:
Andreea Miruna Nemecz

Bucarest
-2012-

TABLE DES MATIÈRES

Partie I- L'état actuel des connaissances

I. Phosphatases, régulateurs de l'homéostasie

1. Définition, mécanisme d'action et la classification
2. Protéines phosphatases (PP)-classification

II. Protéines Tyrosine Phosphatases (PTP)

1. La classification de PTP
2. La structure de PTP
3. La génétique de PTP
4. Le substrat reconnaissance de PTP
5. La réglementation des PTP
    a. Le clivage protéolytique
    b. Phosphorylation
    c. Dimérisation
    d. Oxydation
    e. D'autres modifications post-traducttionnelles (sumoilation, acétylation)
    f. L'inhibition de l'activé enzymatique /expression de la protéine de PTP

III. La signalisation intracellulaire de PTP

1. Localisation et substrates cellulaires
2. Vasculaire PTP – le rôle dans la physiologie vasculaire et la pathologie
    A. PTP dans les cellules endothéliales
        a. PTP impliqués dans l'angiogenèse
            - VEGFR et PTP
            - Tie2 et PTP
        b. PTP impliqués dans l'adhésion et la motilité
            - Intégrines et PTP
            - PECAM et PTP
        c. PTP impliqués dans l'adhésion intracellulaire
            - Cadhérines et PTP
    B. PTP dans les cellules musculaires lisses
        PTP impliqués dans l'angiogenèse
            - PDGFR et PTP
            - AT et PTP
            - NO et PTP
3. L'implication PTP dans le diabète sucré
4. Le rôle de PTP dans d'autres maladies

Partie II – Les contributions originales

A. INTRODUCTION ET OBJECTIFS

B. CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES

C. DES ÉTUDES EXPÉRIMENTALES

I. „*in vitro*" modèle expérimental–cellules musculaires lisses dans cultura; L' effets du stress oxydatif, de la stimulation par l'insuline et des inhibiteurs sur les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire: molécules concernées

1. L'effet de la *forte concentration de glucose*, le *stress oxydatif* et *l'insuline* sur :
- ERK ½ contrôlée mitogène voie
- contrôlée par voie metabolique actif Akt
- voie de signalisation contrôlées par la déphosphorylation de PTP-1B

Résultats et discussions

2. L'effet de *l'hyperglycémie* et le *facteur de croissance PDGF-BB* sur PTP-1B et les molécules de signalisation de l'insuline voie

Résultats et discussions

3. La modulation de l'expression de protéins et de l'activité des molécules de la voie de signalisation insuline (ERK ½ , Akt and **PTP-1B**) à l'aide d'*oxydants/antioxydants* et des *inhibiteurs*

a. L'effet des *oxydants* et des *inhibiteurs*

Résultats et discussions

b. L'influence de l'*oxydation sur les antioxydants* induite par une concentration élevée en glucose, ainsi que le facteur de croissance PDGF-BB

Résultats et discussions

II. „*in vivo*" modèle expérimental – Hamsters Syriens Dorés avec streptozotocine diabète; Phosphorylation/Déphosphorylation des événementes dans l'aorte

Résultats et discussions

III. Pacients atteintes de l'obésité et obésité associée au diabéte de Type II; Molécules de la voie de signalisation d'insuline

Résultats et discussions

D. Discussions générales

BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES PUBLICATIONS

MOTS-CLÉS

Phosphatases

Kinases

Déphoshorylation

Signalisation intracellulaire

Régulateurs négatifs

Pathologie vasculaire

Insuline

Diabète

L’homéostasie

Glycémie

Phosphatases sont groupe d'enzymes qui dehoshorylate par d'un groupe phosphate à partir de son substrat. Ils catalysent l'hydrolyse des monoesters de l'acide phosphorique dans une molécule et un ion phosphate avec un groupe hydroxyle libre. Cette action est directement oppose à celle de phophorylases et les kinases, qui sont attachées à des groupes phosphates à leurs substrats à l'aide de molécules énergétiques tels que l'ATP.

Ainsi que les kinases, les phosphatases regular la phophorylation état de la cellule. L' équilibre entre les événements contrôlés par ces enzymes joue un rôle important dans la signalisation intracellulaire.

Depuis protéines kinases (PK) phophorylates fréquemment des substrats des protéines sur résidus tyrosine, sérine et thréonine, la protéine phophatases (PP) exercer l'effet d'engagement réversible habituellement les mêmes acides aminés dans les protéines.

Protéines tyrosine phosphatases (PTP) sont enzyme qui élimine groupes phosphate à partir de résidus de tyrosine dans les protéines différentes. Phophorylation de protéines sur tyrosine résidus (pTyr) est un sujets communs de modifications post-traductionnelles qui peuvent créer une reconnaissance nouvelle pour les interactions entre protéines et la localisation cellulaire, affecter la stabilité des protéines et l'activité enzymatiqué. Ils peuvent aussi êntre un des éléments clés de réglementation dans le voies de traduction du signal et ils sont très importants dans le contrôle de la croissance cellulaire, la prolifération et la différenciation.

PTP sont des régulateurs essentiels de la transduction du signal dans des conditions normales et physiopathologiques. Ces protéines exercent un effet régulateur sur la signalisation de transduction à différents niveaux par la déphosphorylation des récepteurs membranaires tels que protéines tyrosine kinases (PTK) et des canaux ioniques. Ils peuvent moduler cascades de signalisation par la déphosphorylation de molécules adaptatrices, le kinases intracellulaires et des facteurs de transcription. PTK ont été identifiés comme cibles pour PTP. PTP beaucoup plus déphosphorylate une PTK, et presgue chaque PTK est déphosphorylée par plus d'une PTP.

Selon la spécificité de substrat, vasculaire PTP contribue à la pathologie vasculaire. PTP sont des régulateurs essentiels des événements de signalisation dépendentes de la phosphorylation de la tyrosine, et peuvent représenter de nouvelles cibles pour une intervention thérapeutique dans une variété de maladies humaines. PTP sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire et cascades de signalisation mitogéniques de l'Ang II, l'insuline, l'IGF-1, EGF at PDGF dans plusieurs types de cellules, y compris les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) (Marrero, 2004).

Parce que d,une étape cruciale de réglementation dans la transduction signalisation de l'insuline est la déphosphorylation de molécules de signalisation par PTP, il est plausible que l'activité accrue d'un ou plusier PTP pourrait conduire à l'insulino-résistance (Choi et al., 2010).

La premiére partie de mon ouvrage „**L'état actuel des connaissances**" présente PTP out au long de trois chapitres.

Le premier chapitre présente la classification et mécanisme catalytique des phophatases. L'équilibre entre les réactions exercées par les phophatases et celui effectué par les kinases semble être d'une grande importance dans la signalisation intracellulaire. Phosphatases jouent un rôle crucial dans l'homéostasie.

Le deuxiéme chapitre décrit la classification et de la structure PTP. En outre, révèle certains aspects concernanat le reconnaissance du substrat et mécanisme d'action de PTP, ainsi que les principaux processus de régulation de l'action des PTP

Dans le dernier chapitre on montre la localisation des PTP et leurs molécules de substrate. Cette partie de mon travail présente PTP localisée dans la paroi vasculaire. Selon la localisation de types de cellules, PTP vasculaires réguler les processus de l'angiogenèse comme l'adhésion cellulaire et la motilité. PTP contrôler les voies de signalisation impliquant les facteurs de croissance et des molécules d'adhésion. De cette façon, PTP ont un rôle crucial dans la physiologie et la pathologie vasculaire. Dans le môme chapitre sont présentés PTP qui régule la voie de signalisation du récepteur d'insuline. Ces enzymes jouent un rôle important dans la signalisation de l'insuline en réduisant la signalisation et la déphosphorylation récepteur de l'insuline. Avec le diabète sucré il décrit également certains autre pathologies dans lesquelles PTP jouent un rôle central. Pour l'activité des PTP, il est important de l' état d'oxydation des enzymes, ainsi que les processus d'oxydation/antioxydation développé à ce niveau.

Notre reserche, axé sur la recherche de nouvelles méthodes pour la manipulation activité des PTP, en utilisant des inhibiteurs et des effets des oxydants/antioxydants sur des molécules clés de la voie signalisation de l'insuline. Par conséquent, dans la deuxième partie de mon travail „**Les contributions originales**", il ya eu deux objectifs majeurs :

1. L'analyse de changements induits par hyperglycémie dans le niveau protéique de PTP-1B, ainsi que du niveau de la protéines des kinases impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline. ***(chapitre I, II si III)***

1a. Le consequences de peroxide d'hydrogène et action de l'insuline.

1b. Les effets de la stimulation avec facteur de croissance PDGF-BB.

Les modèles expérimentaux:

- „*in vitro*", les cellules musculaires lisses isolées de l'aorte humaine, lignée cellulaire
- „*in vivo*", hamsters dorés syriens injection de streptozotocine
- un matériau biologique humain, des pacients atteintes de l'obésité et obésité associée au diabéte de Type II

2. Enquête sur les mécanismes par lesquels les oxydants/antioxydants et des inhibiteurs agissent sur PTP-1B et les kinases de signalisation de l'insuline voie.***(chapitre I)***

2a. Le rôle du glucose élevé et orthovanadate de sodium.

2b. Modulation de l'expression des molécules of molecules dans des conditiones hyperglycémiques et stimulation de PDGF-BB après l'action de catalase et superoxyde dismutase.

Les modèles expérimentaux:

- „*in vitro*", les cellules musculaires lisses isolées de l'aorte humaine, lignée cellulaire

DISCUSSIONS GÉNÉRALES

Appréhender les voies de signalisation ainsi que des molécules impliquées dans la signalisation cellulaire de paroi vasculaire, sont essentiels pour une meilleure compréhension de diabète associés à des dysfunctionnements endothéliaux.

Afin de mieux comprendere la physiopathologie de la structure et l'activité enzymatique de la PTP les études menées poursuivi deux objectifs principaux:

1. Changements de la teneur en protéines des molécules de la voie de signalisation d'insuline induite par le glucose élevé associé à la stimulation des facteurs de croissance et des antioxydants ***(chapitre I, II and III).***
2. Les mécanismes par lesquels les antioxydants et des inhibiteurs agissent sur les molécules de la voie de signalisation d'insuline, en rétablissant la fonction physiologique ***(chapitre I).***

Results des „ Les contributions originales" présentés sur trois chapitres:

1. Glycémie élevée, le stress oxydatif et l'insuline induit un déséquilibre de la signalisation des molécules d'insuline phosphorylation dans les CML. L'hyperglycémie déterminants sur l'expression de molécules (à l'exception Akt activée), le stress oxydatif a le même effet (moins de PTP-1B), tandis que l'insuline exerce des effets antagonique des deux molécules;

L'originalité de l'étude: ***J'ai démontré que la surexposition des CML à glycémie élevée a un effet activateur sur une forte Akt. ERK ½ était judicieux de*** H_2O_2 ***, mains ne réspondent pas à l'insuline. Exposition de longue durée à des CML une concentration encore plus élevée de glucose (soit 30 mM) conduit à l'apparition d'une bande supplémentaire réactif avec l'anticorps PTP-1B, de masse moléculaire apparente légèrement supérieur à 51 kDa.***

2. Stimulation de la CMS avec PDGF-BB détermine une surexpression de molécules de signalisation d'insuline. Alors que l'expression des protéines PTP-1B est augmentée

par stimulation avec PDGF-BB d'une manière dose-dépendante, pAkt et pERK ½ atteindre une valeur maximale de 2 ng / ml.

L'originalité de l'étude consiste: ***stimulation par le PDGF-BB des CML cultivées dans du glucose élevé, amplifie l'effet de PDGF-BB sur les molécules de signalisation d'insuline***

3. Entretien des CML de la glycémie élevée ainsi que dans la stimulation aiguë H_2O_2, entraînent une diminution de l'activité des PTP duo à l'oxydation. NaVO4, non spécifique l'inhibiteur des PTP, induit la diminution de l'expression des protéines PTP-1B suivie d'une modification moléculaire de ½ pAkt et pERK

L'originalité de l'étude ***J'ai établi qu'une partie de l'oxydation endogène (glycémie élevée) et exogènes un (H_2O_2) responsable de activation des PTP réduite sont réversibles. Dans une hyperglycémie, une enzyme d'oxydation PTP-1B sont également réversible, susceptible d'influencer l'activité catalytique de la phosphatase et la régulation de cette voie de signalisation de l'insuline. Dans des conditions élevées de glucose, NaVO4 conduit à PTP-1B régulation à la baisse dans les CML***

4. La surexposition des molécules clés de la voie de signalisation d'insuline, suite à une culture prolongée des CML dans des conditions oxydantes hyperglycémiques, peut être inversé en antioxydants. La superoxyde dismutase et de la catalase sont également en mesure de la teneur en protéines de rétablir ces molécules, augmenté en raison de oxydations à la suite de la stimulation du PDGF-BB

L'originalité de l'étude consiste: ***la fois l'exercice antioxydants effet important sur hyperglycémis et PDGF-BB seul, engendrés par les oxydations, mais surtout sur l'hyperglycémie et PDGF-BB cumulatif, engendrés par les oxydations***

5. Dans hamsters dorés syriens injection de streptozotocine, déséquilibre de l'hyperglycémie diabétique, l'expression de phosphatases (c.-à-PTP-1B) par rapport aux kinases (PI3K soit activé et Akt) de la voie de signalisation de l'insuline. Ce déséquilibre est associé à la perméabilité endothéliale marquée et l'apoptose SMC, et peut également souligner le dysfonctionnement paroi aortique comme conséquence de nombreux changements dans ces cellules.

L'originalité de l'étude consiste: ***démonstration de circulation effets hyperglycémie sur l'équilibre entre les kinases / PTP-1B qui agit dans la paroi aortique, dans le cas du diabète de type I.***

6. L'obésité, ainsi que l'obésité associée à diabète de type II influence l'expression protéique des molécules associées à la signalisation de l'insuline. Dans les artérioles du tissu adipeux sous-cutané, l'obésité induit une régulation négative des molécules de signalisation d'insuline. Ce processus est ralenti dans le cas de l'obésité associée avec le diabète de type II.

L'originalité de l'étude consiste: ***J'en ai conclu que dans les deux patients obèses et obèses associés aux patients diabétiques de type II, les artérioles du tissu adipeux sous-cutané ont montré des changements dans l'expression des molécules de signalisation de l'insuline dans les deux maladies importantes.***

Le déséquilibre dans l'hyperglycémie induite par événements de la phosphorylation / déphosphorylation sont accompagnés de plusieurs oxydations réversibles et irréversibles qui peuvent interférer au diabète associé dysfonctionnement vasculaire de la paroi aortique. Utilisation PTP antioxydants ainsi que les inhibiteurs pourraient inverser les changements survenus dans les cellules musculaires lisses ou des cellules endothéliales et qui peuvent améliorer la fonction vasculaire. Envisage donc de PTP cibles thérapeutiques apporterait de nouveaux éléments dans la physiopathologie cardiovasculaire.

BIBLIOGRAPHIE:

1. Marrero, M.B. Introduction to JAK/STAT signaling and the vasculature. *Vascul Pharmacol*. 2005; **43**: 307–309

2. Choi, K. And Kim, Y.-B., Molecular Mechanism of insulin Resistance in Obesity and type 2 Diabetes. *Korean J Intern Med*. 2010; **25**: 119-129

LISTE DES PUBLICATIONS:

Articles publiés dans des revues indexées ISI avec facteur d'impact

1. Popov Doina, **Nemecz Miruna**, Dumitrescu Madalina, Georgescu Adriana, Böhmer Frank D. Long-term high glucose concentration influences Akt, ERK1/2, and PTP1B protein expression in human aortic smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 388(1):51-55, 2009 (IF: 2.64)

2. Adriana Georgescu, Doina Popov, Anamaria Constantin, **Miruna Nemecz**, Nicoleta Alexandru, Daniel Cochior, Aura Tudor. Dysfunction of human subcutaneous fat arterioles in obesity alone or obesity associated with Type 2 diabetes. *Clinical Science,* 120(10): 463-472; 2011 (IF: 4.2)- premiat in 2011

3. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, **Miruna Nemecz,** Irina Titorencu, Doina Popov. Enoxaparin reduces adrenergic contraction of resistance arterioles in aging and in aging associated with diabetes via engagement of MAP kinase pathway. *Blood Coagulation and Fibrinolysis,* 22(4): 310:316, 2011 (IF: 1.4)-premiat in 2011

Articles publiés dans des revues indexées pour la base de données internationale

Miruna Nemecz, Doina Popov, Adriana Georgescu. Phosphorylation/dephosphorylation signaling events in the aorta of streptozotocin-injected Golden Syrian Hamsters. Annals of RSCB, vol XV, issue 1, 28-34, 2010, edited by A. Ardelean et. al. (indexat CNCSIS B+)

Les résumés présentés lors de réunions internationales

1. Microparticles as potential markers in venous insufficiency.A. Georgescu, N. Alexandru, H. Maniu, **M. Nemecz**, D. Popov *in Book of Abstracts , at Romanian Society for Cell Biology at 25 years-Aniversary Workshop:"From Basic Science to Terapeutic Applications"*. p.4, 2007, Bucharest, Romania

2. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Manuela Amuzescu, **Miruna Nemecz,** Constantin Zamfir, Horia Maniu, Adrian Badila. Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles, in *Journal of Vascular Research, vol. 45, supplements 2*, p.146, at *"25th Conference of the European Society for*

Microcirculation: Integrating Vascular Biology & Medicine Basic and Clinical Science",August 26-29, 2008, Budapest, Hungary

3. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Manuela Amuzescu, **Miruna Nemecz,** Eugen Andrei, Constantin Zamfir, Horia Maniu, Adrian Badila, Maya Simionescu. Elevated level of circulating microparticles in chronic venous insufficiency. *in Book of Abstracts*, p. 31, at Biomedicine Workshop"*From fundamental research to therapeutic applications", "Conference, Diaspora in Romanian Sciences Research",* September 17-18, 2008, Bucharest, Romania

4. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Manuela Amuzescu, **Miruna Nemecz,** Constantin Zamfir, Horia Maniu, Adrian Badila. Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles. *Journal of Clinical Lipidology*, vol. 2, no. 5S, p. 64-67- *at 7th International Symposium on "MULTIPLE RISK FACTORS IN CARDIOVASCULAR DISEASES – Prevention and Intervention – Heath Policy"*, October 22-25, 2008, Venice, Italy

5. M. Nemecz, A. Georgescu**,** D. Popov. Protein Tyrosine Phosphatase 1B expression in the smooth muscle cells in aorta in hyperglycemia conditions, at "Biomedicine Workshop, *From fundamental research to therapeutic applications", "Conference, Diaspora in Romanian Sciences Research",* September 17-18, 2008, Bucharest, Romania

6. A. Georgescu**,** N. Alexandru, D. Popov, M. Amuzescu, E. Andrei, **M. Nemecz**, C. Zamfir, A. Badila, M. Simionescu. Elevation of endothelial and platelet microparticles in patients with chronic venous insufficiency, at *XXII Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis* , July 11-16, 2009, Boston , USA

7. L-D. Popov, **M. Nemecz**, M. Dumitrescu, A. Georgescu**,** F. D. Böhmer .Long time culture of human aortic smooth muscle cells in high glucose concentration up-regulates ERK1/2 activation and PTP1B protein expression, at *45th EASD Annual Meeting,* Vienna, Austria, 29.09.2009-02.10.2009, published in *Diabetologia*, 52, Suppl. 1, p.S515, no. 1336, 2009

8. Miruna Nemecz, Adriana Georgescu, Doina Popov. Influence of antioxidants on human vascular smooth muscle cells grown in high glucose, in *Bulletin of Romanian Society for Cell Biology*, p. 91, no.39, at The *3rd International Congress and 29th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology*, June 8-12, 2011, Arad-Szeged, Romania-Hungary

9. Miruna Nemecz, Adriana Georgescu, Doina Popov. The effect of antioxidants on high glucose and platelet derived growth factor stimulated human vascular smooth muscle cells. *'Inflammation and Cardiovascular Disease" Summer School*, Obergurgl, Austria, September 29 - October 2, 2011

10. Adriana Georgescu**, Miruna Nemecz**, Nicoleta Alexandru, Aura Tudor, Daniel Cochior, Doina Popov**.** Dysfunction of Human Subcutaneous Fat Arterioles in Obesity Alone or Obesity Associated with Type 2 Diabetes, *at '4th Annual Meeting of the Diabetes and Cardiovascular Disease EASD Study Group',* October 27–29, 2011, Munich, Germany, Book of Abstracts, p.37.

11. M. Nemecz, A. Georgescu**,** D. Popov, M. Simionescu. Influence of catalase and superoxide dismutase on human vascular smooth muscle cells grown in high glucose. at *'4th Annual Meeting of the Diabetes and Cardiovascular Disease EASD Study Group',* October 27-29, 2011, Munich, Germany, Book of Abstracts, p.33

<u>Les résumés présentés lors des réunions nationales</u>

1. A. Georgescu**,** N. Alexandru, M. Amuzescu, **M. Nemecz**, C. Zamfir, H. Maniu, A. Badila, D. Popov. Insuficienta venoasa cronica este asociata cu un nivel crescut de microparticule circulante/ Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles, *in Buletinul SNBC/ in Bulletin of Romanian Society for Cell Biology* , pag . 50/p. 50, nr.36/no.36, *la a XXVI-A Sesiune Stiintifica Anuala a Societatii Nationale de Biologie Celulara/ at The 26th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology ,* 12-15 iunie 2008/ June 12-15, 2008, Cluj-Napoca, Romania

2. Miruna Nemecz, Adriana Georgescu**,** Doina Popov. Expresia protein tirozin fosfatazei 1B in celulele musculare netede si aorta in conditii de glucoza crescuta/The expression of protein tyrosine phosphatase 1B in smooth muscle cells and aorta in hyperglycemia conditions, *in Buletinul SNBC/ in Bulletin of Romanian Society for Cell Biology* , pag . 52/p.52, nr.36/no.36, la a *XXVI-A Sesiune Stiintifica Anuala a Societatii Nationale de Biologie Celulara/ at The 26th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology,* 12- 15 iunie/June 12-15, 2008, Cluj-Napoca, Romania

Institutul de Biologie şi Patologie Celulară
"Nicolae Simionescu"
Strada B. P Hașdeu, nr. 8, CP 35 – 14, București, România
Tel: (+4021) 319.45.18; 319.45.20; www.icbp.ro

INSTITUTUL DE BIOLOGIE ŞI PATOLOGIE CELULARĂ "NICOLAE SIMIONESCU"
INTRARE / IEŞIRE nr. 648
Ziua 30 Luna 09 Anul 2022

Declarație de angajament față de

Carta Europeană a Cercetătorilor și

Codul de Conduită pentru Recrutarea Cercetătorilor

Institutul de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu" (IBPC-NS) Bucureşti, România, reprezentat de directoarea sa, Dr. Maya Simionescu, membră a Academiei Române, îşi declară angajamentul faţă de principiile convenite prin Carta Europeană a Cercetătorilor şi Codul de Conduită pentru Recrutarea Cercetătorilor.

Prin aprobarea Cartei şi Codului, IBPC-NS recunoaşte valoarea principiilor sale şi planifică să le aplice. Conştient că politica de resurse umane reprezintă baza calităţii şi continuităţii cercetării excelente, IBPC-NS îşi propune să adapteze liniile directoare şi procedurile instituţionale la principiile politicii europene în acest domeniu.

IBPC-NS caută în mod constant să îmbunătăţească calitatea carierelor cercetătorilor, să le extindă oportunităţile, să educe şi să încurajeze tinerii cercetători, dispuşi să contribuie la dezvoltarea unui Spaţiu European de Cercetare (SEC) mai competitiv, inovator şi atractiv.

Prin urmare, după aprobarea principiilor Cartei şi Codului, facem cunoscut angajamentul de a implementa şi certifica o Strategie de Resurse Umane pentru Cercetători (HRS4R) în institutul nostru, care va promova eforturile noastre pentru cercetare şi educaţie de înaltă calitate în cadrul IBPC-NS, ca parte a SEC.

Dr. Maya Simionescu
Director
Membru al Academiei Române

ACADEMIA ROMÂNĂ Institutul de Biologie şi Patologie Celulară "NICOLAE SIMIONESCU" BUCUREŞTI

Institute of Cellular Biology and Pathology
"Nicolae Simionescu"

8, B. P Hasdeu Street, PO-Box 35 – 14, Bucharest, Romania

INSTITUTUL DE BIOLOGIE
ȘI PATOLOGIE CELULARĂ
"NICOLAE SIMIONESCU"
INTRARE / IEȘIRE nr. 648
Ziua 30 Luna 09 Anul 2022

Declaration of commitment to
The European Charter for Researchers and
The Code of Conduct for the Recruitment of Researchers

The Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" (ICBP-NS) – Bucharest, Romania, represented by its Director Dr. Maya Simionescu, member of the Romanian Academy, declares its commitment to the principles agreed upon by the European Charter for Researchers and the Code of Conduct for Recruitment of Researchers.

By endorsing the Charter & Code, ICBP-NS recognizes the value of its principles and plans to apply them. Aware that the Human Resource policy is the basis for the quality and continuity of excellent research, ICBP-NS aims to adapt the institutional guidelines and procedures to the principles of the European Policy in this area.

ICBP-NS is constantly seeking to improve the quality of researchers' careers, expand their opportunities, educate and encourage young researchers, willing to contribute to the development of a more competitive, innovative, and attractive European Research Area (ERA).

Therefore, having endorsed the principles of the Charter and Code, we hereby make known our commitment to implement and certify a Human Resources Strategy for Researchers (HRS4R) in our institute, which will promote our endeavors for high-quality research and education in ICBP-NS as part of the ERA.

Dr. Maya Simionescu
Director
Member of the Romanian Academy

ACADEMIA ROMÂNĂ Institutul de Biologie și Patologie Celulară "NICOLAE SIMIONESCU" BUCUREȘTI

Phones: (+4021) 319.4518; 319.4520: Fax: (+4021) 319.4519
e-mail: maya.simionescu@icbp.ro

METODOLOGIA ORGANIZĂRII ŞI SUSȚINERII TEZEI DE DOCTORAT

Metodologia organizării şi susținerii tezei de doctorat

I DISPOZIȚII GENERALE

Prezenta metodologie a fost elaborată în acord cu prevederile următoarelor acte normative:

- ***Legea educației naționale nr. 1/2011, cu modificările şi completările ulterioare;***
- ***Hotărârea Guvernului nr. 681/2011 privind aprobarea Codului studiilor universitare de doctorat, cu modificările şi completările ulterioare;***
- ***Ordinul nr. 5229/2020 din 17 august 2020 pentru aprobarea metodologiilor referitoare la acordarea atestatului de abilitare, acordarea titlului de doctor, precum şi la soluţionarea sesizărilor cu privire la nerespectarea standardelor de calitate sau de etică profesională, inclusiv cu privire la existenţa plagiatului, în cadrul unei teze de doctorat;***
- ***Hotărârea nr. 134/2016 din 2 martie 2016 pentru modificarea şi completarea Codului studiilor universitare de doctorat, aprobat prin Hotărârea Guvernului nr. 681/2011;***
- ***Legea nr. 111/1995 privind Depozitul Legal de documente;***
- ***Ordonanţă de Urgenţă nr. 87/2018 din 27 septembrie 2018 privind modificarea şi completarea Legii educaţiei naţionale nr. 1/2011.***

Institutele de cercetare ale Academiei Române abilitate să organizezeze studii universitare de doctorat sunt:

1. Institutul de Statistică Matematică şi Matematică Aplicată ”Gheorghe Mihoc-Caius Iacob”
2. Institutul de Matematică "Simion Stoilow"
3. Institutul Astronomic
4. Institutul de Chimie Fizică „Ilie Murgulescu”
5. Centrul de Chimie Organică ”Costin D. Nenițescu"
6. Institutul de Geografie
7. Institutul de Geodinamică ”Sabba S. Ștefănescu”
8. Institutul de Biologie şi Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"
9. Institutul de Biochimie
10. Institutul de Biologie
11. Institutul de Virusologie “Ștefan S. Nicolau”
12. Institutul Antropologice "Francisc I. Rainer"
13. Institutul de Speologie ”Emil Racoviţă”

14. Institutul de Lingvistică ”Iorgu Iordan - Al. Rosetti”
15. Institutul de Istorie și Teorie Literară "George Călinescu”
16. Institutul de Arheologie "Vasile Pârvan"
17. Institutul de Istorie "Nicolae Iorga"
18. Institutul de Filosofie si Psihologie ”Constantin Rădulescu Motru”
19. Institutul de Etnografie şi Folclor ”Constantin Brăiloiu”
20. Institutul de Studii Sud Est Europene
21. Institutul Național de Cercetări Economice ”Costin C. Kirițescu”
22. Institutul de Cercetare a Calității Vieții
23. Institutul de Cercetări Juridice „Acad. Andrei Rădulescu”
24. Institutul de Mecanica Solidelor
25. Institutul de Cercetări pentru Inteligență Artificială ”Mihai Drăgănescu”
26. Institutul de Istorie "G. Bariţiu" Cluj-Napoca
27. Institutul de Lingvistică și Istorie Literară “Sextil Pușcariu” Cluj Napoca
28. Institutul de Chimie Macromoleculară ”Petru Poni” Iași
29. Institutul de Istorie "A. D. Xenopol"
30. Institutul de Arheologie Iaşi
31. Institutul de Informatică Teoretică Iași
32. Institutul de Chimie Timișoara ”Coriolan Drăgulescu"

II. TEZA DE DOCTORAT
Elaborare şi susţinere

Studiile universitare de doctorat se finalizează prin elaborarea şi susţinerea publică a unei teze de doctorat. Teza de doctorat trebuie să fie rezultatul unei cercetări ştiinţifice şi să conţină rezultate originale în domeniul cunoaşterii ştiinţifice.

Aceasta este rezultatul unei activităţi de cercetare ştiinţifică desfăşurată de studentu-doctorand sub coordonarea conducătorului de doctorat, pe parcursul programului de studii universitare de doctorat.

Criteriile de evaluare a calităţii unei teze de doctorat urmăresc rezultatele de cercetare prezentate în teză, obţinute în cadrul programului de studii universitare de doctorat. La aprecierea tezei de doctorat, referenţii evaluează şi rezultatele ştiinţifice publicate sau acceptate pentru publicareF.

Studiile universitare de doctorat se finalizează prin susținerea publică a tezei de doctorat, lucrare originală în care este obligatorie menționarea sursei pentru orice material preluat.

Studentul-doctorand este autorul tezei şi îşi asumă corectitudinea datelor şi informaţiilor prezentate în teză, a opiniilor formulate şi a demonstraţiilor făcute în teză.

Conducatorul de doctorat răspunde împreună cu autorul tezei de respectarea standardelor de calitate sau de etică profesională, inclusiv de asigurarea originalității conținutului.

A. Verificarea similitudinilor

În cazul în care sunt îndeplinite toate obligațiile din planul studiilor universitare de doctorat și cele prevazute în contractul de studii, studentul-doctorand și conducătorul de doctorat pot face demersurile pentru susținerea tezei de doctorat.

Studentul-doctorand completează în 3 exemplare ***Cererea referitoare la demararea procedurilor de analiză a similitudinilor și de evaluare a tezei de către comisia de îndrumare*** *(Anexa 1 pct.g)* și formularul ***Date verificare ANTIPLAGIAT*** *(Anexa 2)*.

Cererea referitoare la demararea procedurilor de analiză a similitudinilor și de evaluare a tezei de către comisia de îndrumare, avizată de conducătorul de doctorat, va fi însoțită de teza de doctorat în format digital. Cererea va fi înregistrată la institutul organizator de doctorat (IOD), apoi la registratura Academiei Române. După înregistrarea acesteia, cererea scanată împreună cu teza de doctorat în format digital și formularul ***Date verificare ANTIPLAGIAT*** în format word, se vor transmite la adresele de email: mone@acad.ro și scosaar@acad.ro. În adresa de e-mail se va menționa de către studentul-doctorand solicitarea privind verificarea tezei de doctorat.

Durata verificării nu poate depăși 30 zile de la depunere.

Raportul de similitudini este transmis conducătorului de doctorat pe baza căruia va întocmi în două exemplare ***Rezoluția conducătorului de doctorat*** *(Anexa 3 pct.i)*. Totodată Raportul de similitudini va fi transmis studentului-doctorand și Compartimentului SCOSAAR și Studii Postdoctorale.

B. Comisia de îndrumare. Presusținerea tezei de doctorat

Pentru desfăşurarea doctoratului, studentul-doctorand este sprijinit de o comisie de îndrumare, formată din 3 membri care pot face parte din echipa de cercetare a conducătorului de doctorat, din alte persoane afiliate şcolii doctorale sau din cadre didactice şi de cercetare neafiliate acesteia. Studentul-doctorand susține teza de doctorat în fața Comisiei de îndrumare, presusținere care poate fi publică. După presusținere conducătorul de doctorat și comisia de îndrumare decid asupra depunerii oficiale a tezei și organizării susținerii publice (Anexa 4 pct.s). Procesul verbal, în două exemplare, va fi însoțit de referatul de acceptare al conducătorului de doctorat. Durata evaluării tezei în comisia de îndrumare nu poate depăși 30 zile. Această perioadă se poate prelungi cu maximum 30 de zile în situații

temeinic justificate. La dosarul de doctorat se va atașa documentul ce specifică motivele care au stat la baza prelungirii procesului de evaluare.

În cazul în care comisia de îndrumare recomandă îmbunătățirea, adăugarea unor informații în teza de doctorat care modifică structura tezei care a fost verificată prin sistemul antiplagiat sau propune refacerea tezei până la o anumită dată teza va fi reanalizată atât în ceea ce privește similitudinile cât și de către comisia de îndrumare.

C. Depunerea oficială a tezei de doctorat la Institutul în cadrul căruia studentul-doctorand și-a desfășurat activitatea doctorală

În vederea demarării procedurilor pentru sustinerea tezei de doctorat, la nivelul institutului organizator de doctorat (IOD), studentul-doctorand și conducatorul științific vor ține seama de prevederile impuse de legislația în vigoare pentru organizarea și susținerea publică a tezei de doctorat.

Perioada optimă pentru parcurgerea tuturor etapelor necesare susținerii publice a tezei de doctorat este de cel puțin 120 zile (4 luni) înainte de epuizarea termenului prevazut în Contractul de studii universitare.

Anexele ce vor sta la baza întocmirii dosarului de susținere a tezei de doctorat vor fi întocmite astfel:

- ***(Anexa 1 pct.g) (3 exemplare: un exemplar la IOD și două exemplare la IOSUD);***
- ***(Anexa 2) (2 exemplare: un exemplar la IOD și un exemplar la IOSUD);***
- ***(Anexa 3 pct.i) (2 exemplare: un exemplar la IOD și un exemplar la IOSUD);***
- ***(Anexa 4 pct.s) (2 exemplare: un exemplar la IOD și un exemplar la IOSUD);***
- ***(Anexa 5 pct. h) (2 exemplare: un exemplar la IOD și un exemplar la IOSUD);***
- ***(Anexa 6 pct.w) (2 exemplare semnate pe fiecare pagină: un exemplar la IOD și un exemplar la IOSUD);***
- ***(Anexa 7 pct. x) (2 exemplare: un exemplar la IOD și un exemplar la IOSUD);***
- ***(Anexa 8 pct. k) (3 exemplare: un exemplar la IOD și două exemplare la IOSUD);***
- ***(Anexa 9 pct. j) (2 exemplare: un exemplar la IOD și un exemplar la IOSUD);***
- ***(Anexa 10 pct. p) (2 exemplare: un exemplar la IOD și un exemplar la IOSUD);***
- ***(Anexa 11 pct. n) (2 exemplare: un exemplar la IOD și un exemplar la IOSUD);***
- ***(Anexa 12 pct.o) (2 exemplare: un exemplar la IOD și un exemplar la IOSUD);***
- ***(Anexa 13) (2 exemplare: un exemplar la IOD și un exemplar la IOSUD)***
- ***(Anexa 14 pct. t) (2 exemplare: un exemplar la IOD și un exemplar la IOSUD)***

În urma obținerii deciziei din partea conducătorului de doctorat și a membrilor comisiei de îndrumare asupra depunerii oficiale a tezei și organizării susținerii publice, studentul-doctorand predă la IOD, următoarele DOCUMENTE:

1.1. DOCUMENTE ÎN FORMAT PRINTAT:

1.1.1. ***Cererea referitoare la demararea procedurilor de analiză a similitudinilor și de evaluare a tezei de către comisia de îndrumare (Anexa 1 pct.g)***

1.1.2. ***Referatul conducătorului de doctorat de acceptare a tezei (2 exemplare: un exemplar pentru IOD și un exemplar pentru IOSUD);***

1.1.3. ***Rezoluția conducătorului de doctorat cu privire la Raportul de Similitudine (Anexa 3 pct.i);***

1.1.4. ***Procesul-verbal de la prezentarea tezei de doctorat în fața comisiei de îndrumare (Anexa 4 pct.s);***

1.1.5. ***Teza de doctorat și anexele sale (cel putin 4 exemplare: două exemplare la IOD cel puțin și două exemplare la IOSUD);***

1.1.6. ***Rezumatul tezei de doctorat în limba română și, respectiv, într-o limbă de circulație internațională, care include cuprinsul tezei de doctorat, cuvinte-cheie și sinteza părților principale ale tezei de doctorat (câte un exemplar din fiecare, un exemplar la IOD și un exemplar la IOSUD);***

1.1.7. ***Declarația semnată de studentul-doctorand privind asumarea răspunderii asupra tezei și luarea la cunoștință a prevederilor legale referitoare la art. 143 alin (4) și art. 170 din Legea educației naționale nr. 1/2011 și, respectiv, la art. 65 alin. (5)-(7) și art. 66 alin.(4) din Codul studiilor universitare de doctorat modificat prin HG nr. 134/2016 (Anexa 5 pct. h);***

1.1.8. ***Curriculum Vitae al studentului-doctorand (2 exemplare tipărite, semnate în original pe fiecare pagină, un exemplar pentru IOD și un exemplar pentru IOSUD);***

1.1.9. ***Lista publicațiilor rezultate în urma cercetării științifice din programul de studii doctorale, publicate sau acceptate spre publicare, dacă este cazul, semnată de studentul-doctorand și de conducătorul de doctorat și copii scanate ale respectivelor publicații (Anexa 6 pct.w). Dosarul de doctorat în format fizic va conține un articol relevant tipărit;***

1.1.10. ***Declarația studentului doctorand privind opțiunile acestuia referitor la publicarea tezei de doctorat pe platforma națională (Anexa 7 pct. x);***

1.1.11. ***Propunerea conducătorului/conducătorilor de doctorat privind componența comisiei de susținere publică a tezei de doctorat (Anexa 8 pct. k);***

1.1.12. ***Curriculum Vitae al fiecărui membru din comisia de doctorat (2 exemplare tipărite, semnate în original, un exemplar pentru IOD și un exemplar pentru IOSUD).***

1.2. DOCUMENTE ÎN FORMAT DIGITAL:

1.2.1. ***Un stick pe care sunt înscrise:***

- ***Teza de doctorat și anexele sale (un fișier pdf editabil care conține atât textul integral al tezei de doctorat cât și cuprinsul și bibliografia);***
- ***Rezumatul în limba română al tezei de doctorat împreună cu cuvinte-cheie și cuprinsul (alt fișier în format pdf editabil);***
- ***Rezumatul într-o limbă de circulație internațională al tezei de doctorat împreună cu cuvintele-cheie și cuprinsul (alt fișier în format pdf editabil);***
- ***Curriculum Vitae al studentului-doctorand;***
- ***Curriculum Vitae al fiecărui membru din comisia de doctorat semnat***

în original (scanat distinct pentru fiecare membru în parte).

- ***Copii scanate ale publicațiilor rezultate în urma cercetării științifice din programul de studii doctorale, publicate sau acceptate spre publicare (scanate distinct fiecare articol/publicație etc.);***
- ***Lista publicațiilor rezultate în urma cercetării științifice din programul de studii doctorale, publicate sau acceptate spre publicare, dacă este cazul, semnată de studentul - doctorand și de conducătorul de doctorat atât în format pdf cât și word***

Propunerea conducătorului/conducătorilor de doctorat privind componența comisiei de susținere publică a tezei de doctorat (Anexa 8, pct. k) (3 exemplare) se va înainta Compartimentului SCOSAAR după ce a primit avizul Directorului de Departament și va fi însoțită de următoarele documente în copie: procesul verbal de presusținere, rezoluția conducătorului de doctorat, sumarul raportului de similitudini, cv-urile membrilor comisiei. Comisia de doctorat trebuie să îndeplinească prevederile art. 67 din Codul studiilor universitare de doctorat, aprobat prin Hotărârea Guvernului nr. 681/2011, cu modificările şi completările ulterioare.

Persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul IOD verifică îndeplinirea de către studentul-doctorand a tuturor obligațiilor prevăzute în contractul și planul de studii doctorale, inclusiv obligațiile financiare, dacă este cazul.

Toate documentele ce constituie dosarul de doctorat trebuie sa fie corecte și complete.

Institutul organizator de doctorat (IOD) va emite documentul justificativ înregistrat, care atestă depunerea oficială a tezei de doctorat în vederea susținerii publice și întocmește referatul preliminar susţinerii publice a tezei (Anexa 9 pct. j) (2 exemplare).

D. Demararea procedurii de susținere publică a tezei de doctorat

1. Documentele necesare demarării procedurii de susținere publică a tezei de doctorat se depun la institutul organizator de doctorat (IOD) cu minimum 20 zile calendaristice înainte de data propusă pentru susținerea publică.

2. Lista documentelor necesare demarării procedurii de susținere publică este următoarea:

2.1 Adeverință care atestă depunerea tezei de doctorat la bibliotecă (Anexa 10 pct. p) (2 exemplare);

2.2 Rapoartele conducătorului de doctorat/conducătorilor de doctorat și ale referenților oficiali, membri ai comisiei de doctorat semnate în original (câte 2 exemplare, un exemplar la IOD și un exemplar la IOSUD). Organizarea ședinței de susținere publică a tezei de doctorat poate fi demarată de către IOD **numai**

după ce a primit rapoartele de evaluare ale conducătorului de doctorat /conducătorilor de doctorat și ale tuturor referenților oficiali;

2.3 După aprobarea propunerii conducătorului/conducătorilor de doctorat privind componența comisiei de susținere publică a tezei de doctorat se întocmește ***Cererea pentru fixarea datei de susținere publică a tezei de doctorat.*** Acesta va include în mod obligatoriu data, locaţia şi ora de susţinere, conducătorul sau conducătorii de doctorat, precum şi locul unde textul integral al tezei poate fi consultat în format tipărit (Anexa 11 pct. n) (2 exemplare);

2.4 După avizarea cererii pentru fixarea datei de susținere publică a tezei de doctorat de către conducătorul de doctorat şi de preşedintele comisiei de doctorat, IOD va afișa cu minimum 20 zile calendaristice înainte de data propusă pentru susținere, anunțul susținerii publice pe site-ul institutului (Anexa 12 pct.o) (2 exemplare). Cererea avizată, referatele membrilor comisiei și link-ul unde este afișat anunțul susținerii publice vor fi transmise Compartimentului SCOSAAR și Studii Postdoctorale la adresa de email scosaar@acad.ro. Compartimentul SCOSAAR și Studii Postdoctorale va posta pe site link-ul primit de la IOD;

2.5 Dacă un referent al comisiei de susținere publică a tezei de doctorat nu poate fi prezent la susținerea publică, este necesară completarea de către acesta a unui document (în 2 exemplare semnate ograf) (Anexa 13).

E. Susținerea tezei de doctorat

Pe baza susţinerii publice a tezei de doctorat şi a rapoartelor referenţilor oficiali, comisia de doctorat evaluează şi deliberează asupra calificativului pe care urmează să îl atribuie tezei de doctorat. Calificativele care pot fi atribuite sunt: "Excelent", "Foarte bine", "Bine", "Satisfăcător" şi "Nesatisfăcător".

Dacă studentul-doctorand a îndeplinit toate cerinţele prevăzute în programul de cercetare ştiinţifică şi aprecierile asupra tezei de doctorat permit atribuirea calificativului "Excelent", "Foarte bine", "Bine" sau "Satisfăcător", comisia de doctorat propune acordarea titlului de doctor.

În cazul atribuirii calificativului "Nesatisfăcător", comisia de doctorat precizează elementele de conţinut care urmează să fie refăcute sau completate în teza de doctorat şi solicită o nouă susţinere publică a tezei. A doua susţinere publică a tezei are loc în faţa aceleiaşi comisii de doctorat ca şi în cazul primei susţineri. În cazul în care şi la a doua susţinere publică se obţine calificativul "Nesatisfăcător", titlul de doctor nu se acordă, iar studentul-doctorand este exmatriculat.

Procesul-verbal al susţinerii publice (Anexa 14 pct. t) (2 exemplare) include anexa cu întrebări și răsunsuri precum și următoarele informații:

a) calificativul propus;

b) indicarea comisiei de specialitate a CNATDCU căreia îi este arondat domeniul de studii universitare de doctorat în care a fost absolvit programul de studii;
c) data susţinerii publice a tezei de doctorat.

În anexa Procesului-verbal al susţinerii publice se precizează motivația calificativului acordat și elementele care trebuie refăcute/completate în teza de doctorat.

Institutele au obligația să transmită Compartimentului SCOSAAR și Studii Postdoctorale **în maximum 5 zile de la data susţinerii tezei**, dosarul de doctorat atât în format fizic cât și electronic (stick). Teza de doctorat se va depune în două exemplare. Un exemplar al tezei de doctorat este destinat Fondului intangibil al Depozitului legal care va fi depus de către IOSUD la Biblioteca Națională a României după obținerea titlului de doctor și va fi însoțit de un CD ce va conține teza de doctorat în format pdf editabil.

Dosarul de doctorat

Dosarul de doctorat se constituie în format tipărit şi în format electronic (PDF).

Dosarul de doctorat în format tipărit va conţine următoarele documente:

Adresă de înaintare la care se va atașa opis-ul documentelor:

a) copie a actului de identitate al studentului doctorand;

b) copia certificatului de naştere al studentului doctorand;

c) copia certificatului de căsătorie, dacă este cazul/Documentul administrativ care atestă schimbarea numelui (sentință judecătorească de schimbare a numelui, etc.);

d) CV-ul studentului doctorand;

e) decizia de admitere la programul de studii universitare de doctorat;

f) contractul de studii universitare de doctorat şi actele adiţionale, după caz; Totodată se vor atașa, dacă este cazul, deciziile care au intervenit pe parcursul desfășurării doctoratului. De exemplu: prelungiri/întreruperi/perioadă de grație/schimbare conducător de doctorat/ schimbare titlu teză, etc.

g) cerere semnată de studentul doctorand, înregistrată la Institutul organizator de doctorat (IOD) și Compartimentul SCOSAAR și Studii Postdoctorale, privind demararea procedurilor de evaluare a tezei de către comisia de îndrumare, avizată de conducătorul de doctorat, în vederea presusţinerii;

h) declaraţia semnată de studentul doctorand şi de conducătorul de doctorat privind asumarea răspunderii cu privire la asigurarea originalităţii conţinutului tezei de doctorat, precum şi a respectării standardelor de calitate şi de etică profesională, conform art. 143 alin. (4) şi art. 170 din Legea educaţiei naţionale nr. 1/2011, cu modificările şi completările ulterioare, şi ale art. 65 alin. (5) - (7)

din Codul studiilor universitare de doctorat, aprobat prin Hotărârea Guvernului nr. 681/2011, cu modificările şi completările ulterioare;

i) se vor atașa următoarele documente: Raport sumar de similitudine (raportul primit pe e-mail de la verificarea similitudinilor), rezoluția conducătorului de doctorat;

j) se vor atașa următoarele documente: referatul întocmit de Institutul organizator de doctorat (IOD), preliminar susţinerii publice a tezei, planul studiilor universitare de doctorat;

k) propunerea componenţei comisiei de doctorat, formulată de conducătorul de doctorat şi aprobată de Directorul de Departament și de Președintele SCOSAAR;

l) CV-urile membrilor comisiei de doctorat semnate în original;

m) decizia de numire a comisiei de doctorat;

n) cererea pentru fixarea datei de susţinere publică a tezei de doctorat, avizată de conducătorul de doctorat şi de preşedintele comisiei de doctorat, depusă la Institutul organizator de doctorat (IOD) cu minimum 20 de zile calendaristice înainte de data propusă pentru susţinere;

o) anunţul pentru susţinerea publică, întocmit de Institutul organizator de doctorat (IOD) cu cel puţin 20 de zile calendaristice înainte de data propusă pentru susţinere;

p) adeverinţa privind depunerea unui exemplar tipărit al tezei de doctorat la bibliotecă;

q) rapoartele referenţilor oficiali, membri ai comisiei de doctorat, semnate în original;

r) referatul de acceptare din partea îndrumătorului de doctorat/îndrumătorilor de doctorat, semnat/semnate în original;

s) procesul-verbal al comisiei de îndrumare în vederea depunerii tezei de doctorat la Institutul organizator de doctorat (IOD);

t) procesul-verbal al susţinerii publice a tezei de doctorat şi anexa cu întrebări şi răspunsuri, care conţine propunerea de acordare a titlului de doctor, semnat de toţi membrii comisiei de doctorat;

u) rezumatul tezei de doctorat;

v) teza de doctorat şi anexele sale;

w) lista publicaţiilor rezultate în urma cercetării ştiinţifice din programul de studii doctorale, publicate sau acceptate spre publicare, dacă este cazul;

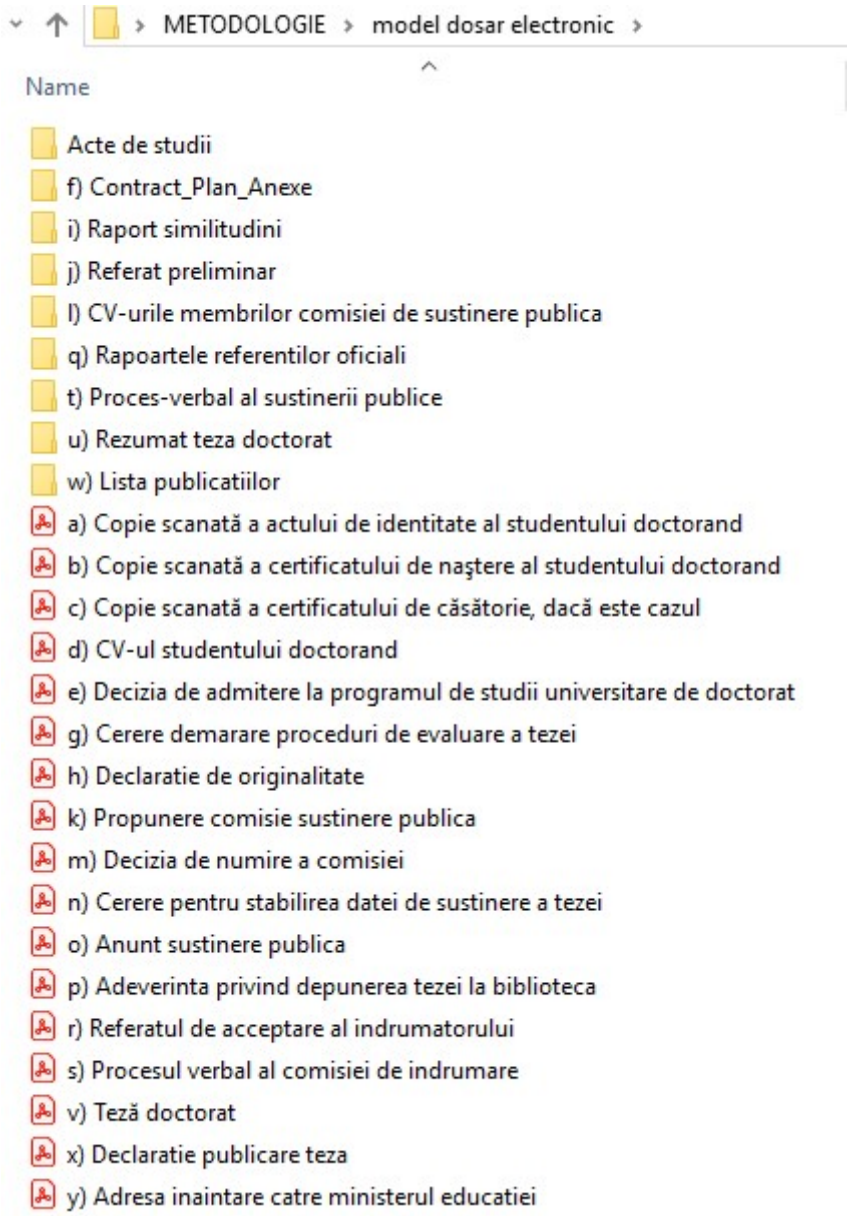
x) declaraţia studentului doctorand privind opţiunile acestuia referitor la publicarea tezei de doctorat pe platforma naţională, în conformitate cu prevederile Hotărârii Guvernului nr. 681/2011 privind aprobarea Codului studiilor universitare de doctorat, cu modificările şi completările ulterioare;

Dosarul de doctorat va cuprinde totodată și următoarele acte de studii:

- Copia diplomei de bacalaureat sau echivalentă (copia va fi certificată conform cu originalul, nume și prenume, semnătura);

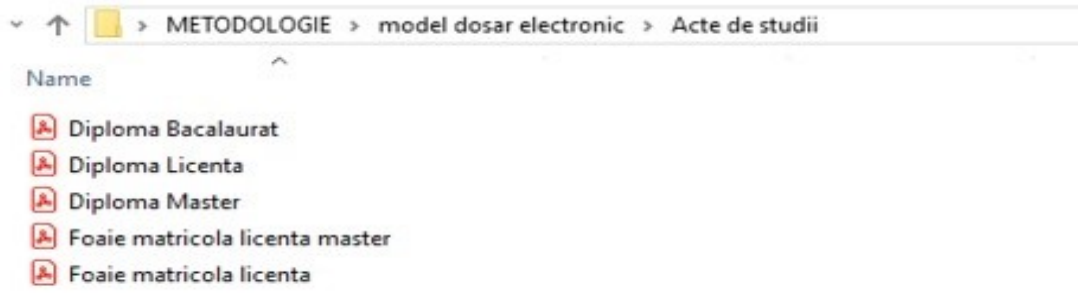
- Copia diplomei de licență sau echivalentă, însoțită de anexele ei, respectiv foaia matricolă sau suplimentul la diplomă (copia va fi certificată conform cu originalul, nume și prenume, semnătura);
- Copia diplomei de master/studii aprofundate sau echivalentă, însoțită de anexele ei, respectiv foaia matricolă sau suplimentul la diploma (copia va fi certificată conform cu originalul, nume și prenume, semnătura);

DOCUMENTE ÎN FORMAT DIGITAL vor fi ordonate pe stick astfel:

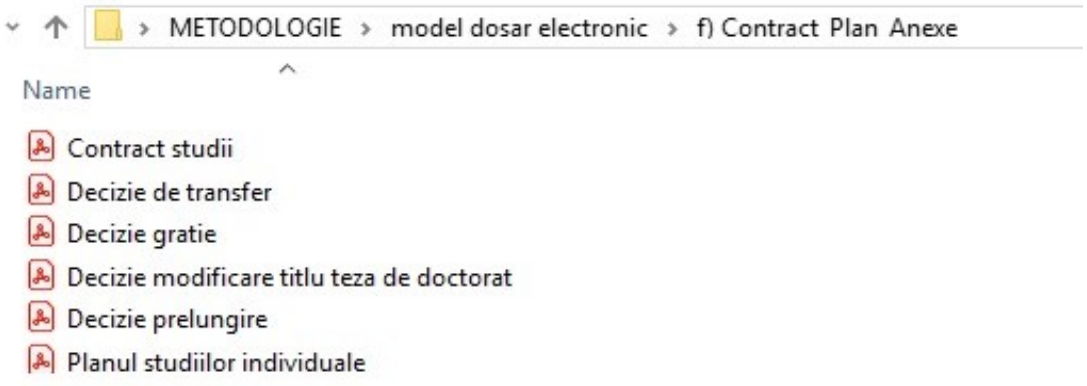


În folderul denumit ***Acte de studii*** se vor regăsi următoarele documente scanate, separat fiecare în parte: Diploma de bacalaureat sau echivalentă, Diploma de licență sau echivalentă, foaia matricolă sau suplimentul la diplomă,

Diploma de master/studii aprofundate sau echivalentă, foaia matricolă a diplomei de master.



a) copie scanată PDF a actului de identitate al studentului doctorand;
b) copie scanată PDF a certificatului de naştere al studentului doctorand;
c) copie scanată PDF a certificatului de căsătorie, dacă este cazul/Documentul administrativ care atestă schimbarea numelui (sentință judecătorească de schimbare a numelui, etc.);
d) copie scanată PDF a CV-ului studentului doctorand;
e) copie scanată PDF a deciziei de admitere la programul de studii universitare de doctorat;
f) copie scanată PDF după contractul de studii universitare de doctorat, după planul studiilor universitare de doctorat şi actele adiţionale, după caz; Totodată se vor atașa, dacă este cazul, copii scanate PDF după deciziile care au intervenit pe parcursul desfășurării doctoratului. De exemplu: prelungiri/întreruperi/perioadă de grație/schimbare conducător de octorat/schimbare titlu teză etc.; Fiecare decizie va fi scanată separat. Toate aceste documente vor fi salvate într-un folder denumit ***f) Contract_Plan_Anexe***

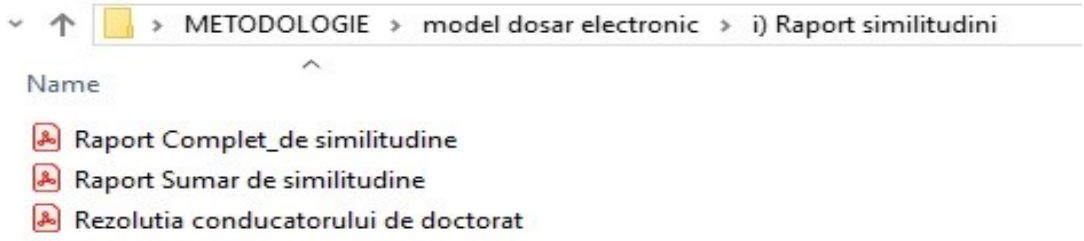


g) copie scanată PDF a cererii semnată de studentul doctorand, înregistrată la la Institutul organizator de doctorat (IOD) și Compartimentul SCOSAAR și Studii Postdoctorale, privind demararea procedurilor de evaluare a tezei de

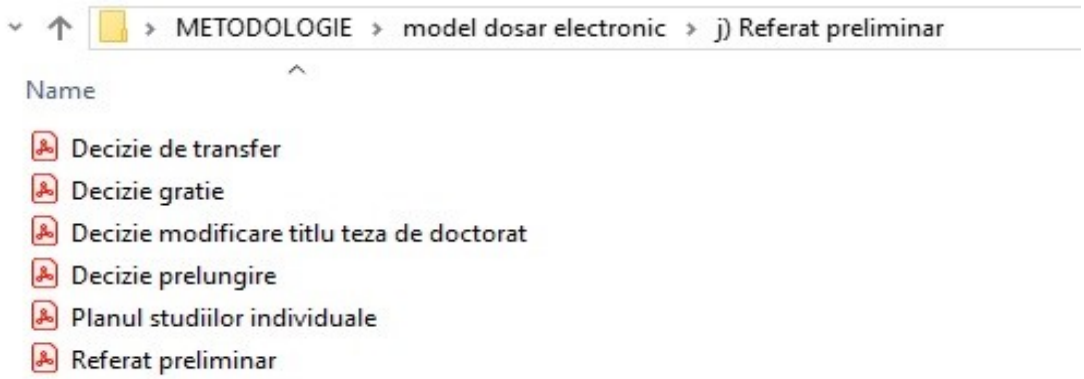
către comisia de îndrumare, avizată de conducătorul de doctorat, în vederea presusţinerii;

h) copie scanată PDF după declaraţia semnată de studentul doctorand şi de conducătorul de doctorat privind asumarea răspunderii cu privire la asigurarea originalităţii conţinutului tezei de doctorat, precum şi a respectării standardelor de calitate şi de etică profesională, conform art. 143 alin. (4) şi art. 170 din Legea educaţiei naţionale nr. 1/2011, cu modificările şi completările ulterioare, şi ale art. 65 alin. (5) - (7) din Codul studiilor universitare de doctorat, aprobat prin Hotărârea Guvernului nr. 681/2011, cu modificările şi completările ulterioare;

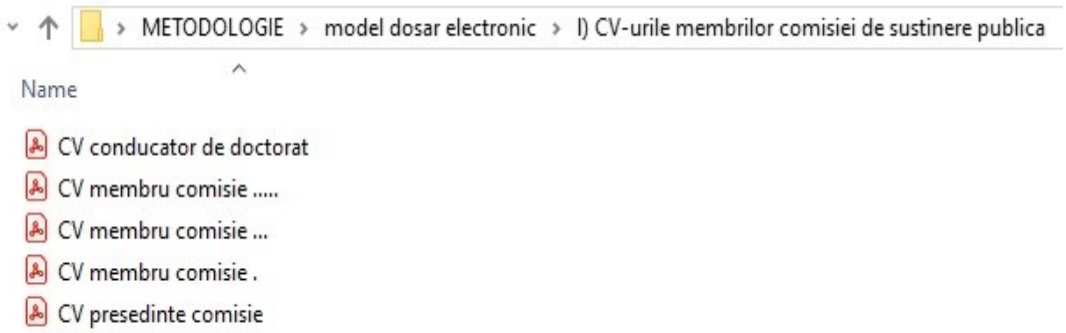
i) În folderul denumit ***i) Raport similitudini*** se vor atașa următoarele documente: Raport sumar similitudine (raportul primit pe e-mail de la verificarea similitudinilor), Raport complet similitudine (raportul primit pe email de la verificarea similitudinilor), rezoluția conducătorului de doctorat scan PDF



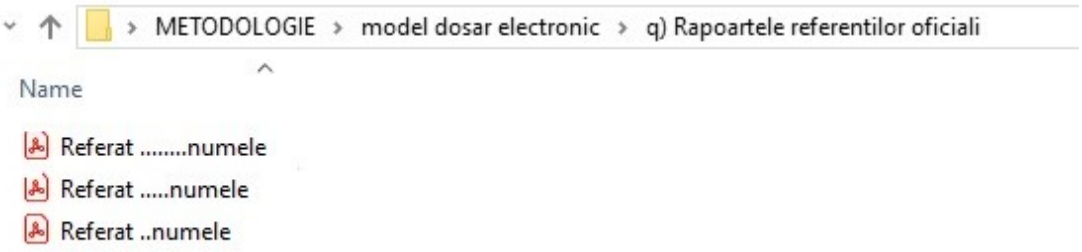
j) În folderul denumit ***j) Referat preliminar*** se vor atașa următoarele documente scanate în format PDF: referatul întocmit de Institutul organizator de doctorat (IOD), preliminar susţinerii publice a tezei, planul studiilor universitare de doctorat şi actele adiţionale, dacă este cazul. Totodată se vor atașa, dacă este cazul, deciziile care au intervenit pe parcursul desfășurării doctoratului. De exemplu: prelungiri /întreruperi/ perioadă de grație/ schimbare conducător de doctorat/schimbare titlu teză, etc. Fiecare decizie va fi scanată separat și denumită în funcție de specificul ei: întrerupere, prelungire, perioadă de grație etc.



k) scan PDF după propunerea componenţei comisiei de doctorat, formulată de conducătorul de doctorat şi aprobată de Directorul de Departament și de Președintele SCOSAAR;
l) CV-urile membrilor comisiei de doctorat scanate în format PDF, scanate separat pentru fiecare membru în parte, în folderul denumit *l) CV-urile membrilor comisiei de sustinere publică;*

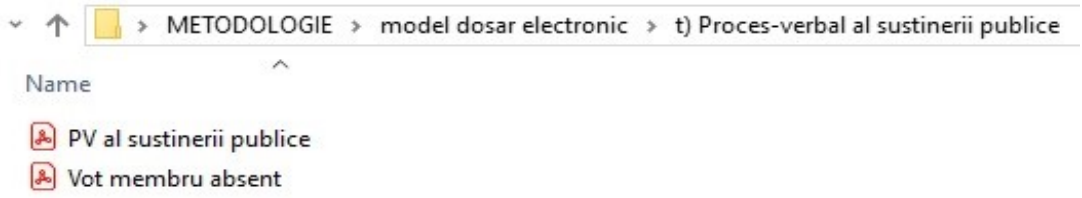


m) scan PDF după decizia de numire a comisiei de doctorat;
n) scan PDF după cererea pentru fixarea datei de susţinere publică a tezei de doctorat, avizată de conducătorul de doctorat şi de preşedintele comisiei de doctorat, depusă la secretariatul şcolii doctorale cu minimum 20 de zile calendaristice înainte de data propusă pentru susţinere;
o) scan PDF după anunţul pentru susţinerea publică, întocmit de Institutul organizator de doctorat (IOD) cu cel puţin 20 de zile calendaristice înainte de data propusă pentru susţinere;
p) scan PDF după adeverinţa privind depunerea unui exemplar tipărit al tezei de doctorat la bibliotecă;
q) rapoartele referenţilor oficiali, membri ai comisiei de doctorat, semnate de aceştia, sub forma unor copii scanate PDF pentru fiecare membru în parte, în folderul denumit: *q) Rapoartele referentilor oficiali;*



r) scan PDF după referatul de acceptare din partea îndrumătorului de doctorat;
s) scan PDF după avizul comisiei de îndrumare în vederea depunerii tezei de doctorat la secretariatul şcolii doctorale;

t) scan PDF după procesul-verbal al susţinerii publice a tezei de doctorat şi anexa cu întrebări şi răspunsuri, care conţine propunerea de acordare a titlului de doctor, semnat de toţi membrii comisiei de doctorat;



u) PDF **editabi,** exclus scan, după rezumatul tezei de doctorat (engleza şi română salvate în folderul denumit *u) Rezumat teza doctorat*);
v) PDF **editabil,** exclus scan, după teza de doctorat şi anexele sale, în format electronic;
w) scan PDF după lista publicaţiilor rezultate în urma cercetării ştiinţifice din programul de studii doctorale, publicate sau acceptate spre publicare, dacă este cazul, şi copii scanate ale respectivelor publicaţii. Se va scana fiecare articol separate în folderul denumit *w) Lista publicatiilor;*

x) scan PDF după declaraţia studentului doctorand privind opţiunile acestuia referitor la publicarea tezei de doctorat pe platforma naţională, în conformitate cu prevederile Hotărârii Guvernului nr. 681/2011 privind aprobarea Codului studiilor universitare de doctorat, cu modificările şi completările ulterioare;

Compartimentul SCOSAAR și Studii Postdoctorale va transmite dosarul de doctorat Secțiilor științifice din cadrul Academiei Române spre avizare. După obținerea avizului, IOSUD solicită Ministerului Educației intrarea în procedura de evaluare la nivelul CNATDCU (Anexa 15 pct.y).

Platforma notifică Secretariatul tehnic al CNATDCU cu privire la finalizarea încărcării dosarului de către IOSUD. Secretariatul tehnic al CNATDCU verifică din punct de vedere administrativ componenţa dosarului electronic de doctorat, în termen de maximum 15 zile de la notificare, şi are obligaţia de a semnala IOSUD respectiv eventualele erori de înregistrare sau lipsa

unor documente. IOD transmite documentele în termen de maximum 3 zile de la notificare către IOSUD.

IOSUD completează dosarul electronic de doctorat în termen de maximum 2 zile cu documentele primite de la IOD.

După validarea administrativă a dosarului electronic de doctorat de către Secretariatul tehnic al CNATDCU, platforma notifică preşedintele comisiei de specialitate a CNATDCU care are arondat domeniul de doctorat vizat pentru obţinerea titlului de doctor.

După constituirea comisiei de evaluare, platforma notifică preşedintele comisiei de specialitate a CNATDCU şi membrii comisiei de evaluare privind declanşarea procesului de evaluare.

Comisia de evaluare analizează dosarul electronic de doctorat din următoarele perspective:

a) relevanţa ştiinţifică;
b) impactul potenţial al rezultatelor şi măsura în care teza aduce contribuţii substanţiale la cunoaştere;
c) originalitatea şi caracterul inovativ sau creativ şi măsura în care studentul doctorand demonstrează abilităţi de gândire critică independentă;
d) măsura în care studentul doctorand a utilizat în mod adecvat metodele şi metodologiile de cercetare;
e) măsura în care modalitatea de prezentare a informaţiilor în cadrul tezei este adecvată;
f) măsura în care studentul doctorand demonstrează înţelegerea literaturii relevante în domeniu şi familiarizarea cu aceasta;
g) măsura în care rezultatele prezentate în teză au fost publicate sau acceptate spre publicare, în urma evaluării de către evaluatori externi (prin peer review), ori stau la baza unor cereri de brevet sau a unor aplicaţii ori măsura în care rezultatele prezentate în teză au potenţialul de a fi publicate în acest fel sau de a fi aplicate;
h) respectarea normelor de bună conduită în activitatea de cercetare-dezvoltare;
i) respectarea standardelor de etică profesională, inclusiv existenţa plagiatului, în cadrul tezei şi/sau al activităţilor.

În cazul în care membrii unei comisii de evaluare au constatat nerespectarea standardelor de etică profesională, inclusiv existenţa plagiatului, în cadrul tezei şi/sau al activităţilor care au dus la realizarea acesteia, Consiliul general al CNATDCU analizează responsabilitatea conducătorului de doctorat sau a şcolii doctorale şi decide aplicarea măsurilor prevăzute de art. 170 din Legea nr. 1/2011, cu modificările şi completările ulterioare.

III. INVALIDAREA TEZEI DE DOCTORAT

În cazul în care decizia CNATDCU este de invalidare a tezei de doctorat, platforma notifică Secretariatului tehnic al CNATDCU şi IOSUD/IOD această decizie însoţită de raportul sintetic de evaluare, conform art. 168 alin. (8) din Legea educaţiei naţionale nr. 1/2011, cu modificările şi completările ulterioare.

În cazul în care CNATDCU emite decizie de invalidare după evaluarea unei teze retransmise CNATDCU conform prevederilor art. 168 alin. (8) din Legea nr. 1/2011, cu modificările şi completările ulterioare, Secretariatul tehnic al CNATDCU propune ministrului educaţiei şi cercetării neacordarea titlului de doctor. În acest caz, ministrul educaţiei şi cercetării emite ordin de neacordare a titlului.

IOSUD/IOD comunică decizia CNATDCU studentului doctorand în termen de maximum 15 zile de la notificare.

Deciziile CNATDCU pot fi contestate în termen de 15 zile de la primirea acesteia de către studentul doctorand.

Contestaţia se înregistrează la Ministerul Educației, însoţită de adresa de comunicare din partea IOSUD privind decizia CNATDCU, şi se încarcă în platformă de Secretariatul tehnic al CNATDCU în termen de maximum 5 zile de la înregistrare.

Decizia CNATDCU cu privire la soluţionarea contestaţiei este semnată de preşedintele Consiliului general, inclusiv prin mijloace electronice, şi încărcată în platformă.

Platforma notifică Secretariatul tehnic al CNATDCU cu privire la decizia CNATDCU.

Secretariatul tehnic al CNATDCU comunică studentului doctorand şi IOSUD/IOD decizia CNATDCU, în termen de 15 zile de la notificare.

CNATDCU nu reia analiza dosarelor privitoare la teze de doctorat care au fost analizate şi invalidate o singură dată de către CNATDCU şi care nu se transmit în termenul de un an de la invalidare, precum şi a dosarelor privitoare la teze de doctorat care au fost analizate şi invalidate de două ori de către CNATDCU, potrivit prevederilor art. 168 alin. (8) din Legea nr. 1/2011, cu modificările şi completările ulterioare.

IV. CONFERIREA TITLULUI DE DOCTOR

CNATDCU, în urma evaluării dosarului de doctorat, propune ministrului educaţiei şi cercetării acordarea sau neacordarea titlului de doctor.

Acordarea titlului de doctor este propusă de CNATDCU şi este aprobată prin ordin al ministrului educaţiei şi cercetării, în conformitate cu prevederile art. 168 din Legea educaţiei naţionale nr. 1/2011, cu modificările şi completările ulterioare, şi cu prevederile Hotărârii Guvernului nr. 681/2011 privind aprobarea Codului studiilor universitare de doctorat, cu modificările şi completările ulterioare.

În baza deciziei CNATDCU privind acordarea titlului de doctor, ministrul educaţiei şi cercetării acordă titlul de doctor prin ordin.

După completarea ordinului de ministru în platformă şi pe baza opţiunilor de publicare completate de IOSUD în platformă, teza şi anexele devin publice pe platforma naţională în conformitate cu prevederile art. 168 alin. (9) din Legea educaţiei naţionale nr. 1/2011, cu modificările şi completările ulterioare, şi ale art. 66 din Hotărârea Guvernului nr. 681/2011 privind aprobarea Codului studiilor universitare de doctorat, cu modificările şi completările ulterioare.

Calitatea de student-doctorand încetează la acordarea titlului de doctor sau la emiterea dispoziţiei de exmatriculare.

EUROPEAN COMMISSION

Community research

Carta Europeana a Cercetatorilor

Codul de Conduita pentru Recrutarea Cercetatorilor

www.europa.eu.int/eracareers/europeancharter

EUR 21620

EUROPEAN RESEARCH AREA

HUMAN RESOURCES AND MOBILITY

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE
Bruxelles, 11.3.2005
C(2005) 576 final

RECOMANDAREA COMISIEI

privind Carta Europeană a Cercetătorilor şi Codul de Conduită pentru recrutarea cercetătorilor

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

Având în vedere Tratatul de înființare a Comunității Europene şi, în special, Articolul 165 al acestuia,

in care:

(1) Comisia a considerat necesar, în ianuarie 2000[1], să înființeze Spațiul European pentru Cercetare ca liant al activității viitoare a Comunității în acest domeniu şi cu intenția de a consolida şi a crea o structură pentru politica europeană de cercetare.

(2) Consiliul european de la Lisabona care a stabilit ca obiectiv al Comunității acela ca aceasta să devină economia cunoaşterii, cea mai competitivă şi mai dinamică din lume, până în anul 2010.

(3) În rezoluția sa din 10 noiembrie 2003[2], Consiliul a evidențiat anumite probleme legate de profesia şi cariera cercetătorilor din Spațiul European de Cercetare şi, în special, a salutat intenția Comisiei de a lucra pentru elaborarea unei Carte Europene a Cercetătorilor şi a unui Cod de conduită pentru recrutarea cercetătorilor.

(4) În viitorul apropiat, o amenințare serioasă pentru puterea inovatoare a UE, pentru capacitățile de cunoaştere şi pentru creşterea productivității o reprezintă reducerea posibilă, care a fost deja identificată, a numărului de cercetători[3], în special din anumite discipline cheie. Acest proces poate prejudicia îndeplinirea obiectivelor stabilite la Lisabona şi Barcelona. În consecință, este imperativ ca Europa să îmbunătățească condițiile de atractivitate a domeniului pentru cercetători şi să consolideze implicarea cercetătoarelor în această activitate. Aceasta se poate realiza prin acordarea de ajutor pentru crearea condițiilor necesare pentru cariere mai susținute şi mai atrăgătoare în domeniul Cercetării şi Dezvoltării[4].

(5) Piatra de hotar pentru progresul cunoaşterii ştiințifice, a dezvoltării tehnologice o reprezintă resurse umane suficiente şi bine pregătite pentru domeniul Cercetării şi Dezvoltării. Astfel se poate

[1] COM(2000) 6 final din 18.1.2000.
[2] Monitorul Oficial C 282, p. 1-2, din 25.11.2003. Rezoluția Consiliului din 10 noiembrie 2003 (2003/C 282/01 privind profesia şi cariera cercetătorilor din Spațiul European pentru Cercetare).
[3] COM (2003) 226 final şi SEC(2003) 489 din 30.4.2003.
[4] SEC (2005) 260.

obține o calitate a vieții şi se poate asigura bunăstarea cetățenilor europeni, în acelaşi timp, contribuindu-se la competitivitatea Europei.

(6) Trebuie introduse şi aplicate instrumente noi de dezvoltare a carierei cercetătorilor, astfel contribuind la îmbunătățirea previziunilor de evoluție a carierei pentru cercetătorii din Europa.

(7) De asemenea, previziuni justificate şi mai vizibile privind evoluția carierei contribuie la construirea unei atitudini pozitive a publicului față de profesia de cercetător şi, prin aceasta, încurajează, mai mulți tineri să îmbrățiseze o carieră în domeniul cercetării.

(8) Un ultim scop politic al acestei Recomandări este acela să contribuie la evoluția unei piețe europene a muncii atractive, deschise şi sustenabile pentru cercetători, în care condițiile cadru să permită recrutarea şi menținerea unor cercetători de calitate înaltă într-un mediu care să conducă la obținerea efectivă de performanțe şi la productivitate.

(9) Statele Membre ar trebui să acționeze astfel încât să ofere cercetătorilor o evoluție sustenabilă a sistemelor carierei în toate etapele, indiferent de situația lor contractuală şi de traseul de Cercetare – Dezvoltare ales. Ele vor trebui să facă toate demersurile pentru a se asigura că cercetătorii sunt tratați ca profesioniști şi ca parte integrantă a instituțiilor în care îşi desfăşoară activitatea.

(10) Cu toate că Statele Membre au făcut eforturi considerabile să depăşească obstacolele administrative şi legale în calea mobilității geografice şi inter-sectoriale, multe din aceste obstacole există încă.

(11) Trebuie încurajate toate tipurile de mobilitate ca parte a unei ample politici de resurse umane pentru domeniul Cercetării – Dezvoltării la nivel național, regional şi instituțional.

(12) Valoarea tuturor necesităților de mobilitate este necesar să fie deplin recunoscută pentru evaluarea carierei şi în cadrul sistemelor de evoluție în carieră a cercetătorilor, astfel garantându-se că o astfel de experiență este valoroasă pentru evoluția lor profesională.

(13) Dezvoltarea unei cariere solide şi politice de mobilitate pentru cercetătorii către[5] şi din Uniunea Europeană trebuie analizată avându-se în vedere situația din țările în curs de dezvoltare şi din regiunile din cadrul şi din afara Uniunii Europene, astfel încât construirea capacităților de cercetare din cadrul Uniunii Europene să nu se realizeze pe cheltuiala statelor sau regiunilor mai slab dezvoltate.

(14) În calitatea lor de persoane care recrutează cercetătorii, sponsorii sau angajatorii acestora trebuie să aibă responsabilitatea de a le oferi cercetătorilor proceduri de selectare şi recrutare, deschise, transparente şi comparabile la nivel internațional.

(15) Societatea trebuie să aprecieze mai mult responsabilitățile şi profesionalismul pe care îl demonstrează cercetătorii în desfăşurarea activității în diverse etape ale carierei lor şi rolul lor cu

[5] COM(2004) 178 final din 16.3.2004.

multiple fațete de lucrători în domeniul cunoaşterii, lideri, coordonatori de proiect, manageri, supraveghetori, mentori, consultanți de carieră sau de comunicatori ştiințifici.

(16) Această recomandare are ca premiză faptul că angajatorii sau sponsorii cercetătorilor au obligația principală de a se asigura că îndeplinesc condițiile legislative la nivel național, regional sau sectorial.

(17) Prin această recomandare se oferă Statelor Membre, angajatorilor, sponsorilor şi cercetătorilor un instrument valoros prin care să se realizeze, pe bază de voluntariat, şi alte inițiative pentru îmbunătățirea şi consolidarea previziunilor de carieră în Uniunea Europeană şi pentru crearea unei piețe a muncii deschise pentru cercetători.

(18) Principiile general şi condițiile evidențiate în această Recomandare sunt rezultatul unui proces de consultare publică la care au fost asociați integral membrii Grupului Executiv pentru Resurse Umane şi Mobiilitate,

PRIN PREZENTA SE RECOMANDĂ:

1. Statele Membre să acționeze în aşa fel încât să facă paşii necesari pentru a se asigura că angajatorii sau sponsorii cercetătorilor dezvoltă şi mențin un mediu care să încurajeze cercetarea şi cultura activității, în care atât indivizii, cât şi grupurile de cercetare să fie apreciate, încurajate şi susținute şi cărora să le fie oferite susținerea materială şi morală care să îi facă să îşi îndeplinească obiectivele şi îndatoririle. În acest context, trebuie acordată, în special, prioritate organizării condițiilor de lucru şi de formare profesională în etapa inițială a carierei cercetătorilor, deoarece aceasta contribuie la opțiunile viitoare şi la atractivitatea unei cariere în domeniul Cercetării şi Dezvoltării.

2. Statele Membre să facă, acolo unde este necesar, demersurile cruciale pentru a se asigura că angajatorii şi sponsorii cercetătorilor îşi ameliorează metodele de recrutare şi sistemele de evaluare/ apreciere a carierei astfel încât să creeze un sistem de recrutare şi de evoluție profesională, mai transparent, deschis, egal şi acceptat la nivel internațional ca o precondiție pentru existența unei reale piețe europene a muncii pentru cercetători.

3. Atunci când îşi formulează şi adoptă strategiile şi sistemele de dezvoltare sustenabilă a carierei pentru cercetători, Statele membre să ia obligatoriu în considerare şi să se ghideze după principiile generale şi condițiile, la care fac referire Carta Europeană a Cercetătorilor şi Codul de conduită pentru recrutarea cercetătorilor, aşa cum este evidențiat în anexă.

4. Statele Membre să facă demersurile necesare pentru transpunerea acestor principii generale şi condiții din domeniul lor de responsabilitate în legislația lor națională sau în standardele lor sectoriale şi/ sau instituționale, precum şi în ghidurile (carte şi/ sau coduri pentru cercetători). Prin aceasta, ele trebuie să ia în considerare marea diversitate a legilor, reglementărilor şi practicilor, care, în diverse state şi în diverse

sectoare, stabilesc traseu, organizarea şi condiţiile de lucru pentru o carieră în domeniul Cercetării – Dezvotării.

5. Statele Membre să trateze aceste principii generale şi condiţii drept parte integrantă pentru mecanismele de asigurare a calităţii instituţiilor, considerându-le drept mijloace de stabilire a criteriilor de finanţare pentru schemele naţionale/ regionale de finanţare, precum şi să le adopte pentru procesele de audit, monitorizare şi evaluare ale organizaţiilor publice.

6. Statele Membre să continue eforturile de depăşire a obstacolelor administrative şi legislative, existente încă, inclusiv a celor care se referă la mobilitatea intersectorială şi la mobilitatea dintre şi în cadrul diferitelor funcţiuni, luând în considerare Uniunea Europeană lărgită.

7. Statele Membre să facă demersurile necesare pentru a se asigura că cerceetătorii se bucură de o asistenţă socială corespunzătoare statutului lor juridic. În acest context, o atenţie specială trebuie acordată drepturilor de pensie, fie cea statutară sau cea suplimentară, pentru cercetătorii care se deplasează între sectorul public şi cel privat din acelaşi stat, precum şi pentru cei care se deplasează în cadrul Uniunii Europene.

Astfel de situaţii trebuie să garanteze că cercetătorii care, în cursul vieţii, şi-au schimbat serviciul sau şi-au întrerupt cariera nu suferă, nemeritat, pierderea drepturilor de asistenţă socială.

8. Statele Membre implementează structurile necesare de monitorizare care să verifice, periodic, aplicarea acestei Recomandări, precum şi modul în care angajatorii, sponsorii şi cercetătorii au aplicat Carta Europeană a Cercetătorilor şi Codul de Conduită pentru Recrutarea Cercetătorilor.

9. Criteriile pentru monitorizare vor fi stabilite şi convenite cu Statele Membre în cadrul activităţii asumate de Grupul executiv pentru Resurse Umane şi Mobilitate.

10. În calitate de reprezentanţi în organizaţiile internaţionale înfiinţate la nivel interguvernamental, Statele Membre iau integral în considerare această Recomandare atunci când propun strategii şi iau decizii care se referă la activităţile respectivelor organizaţii.

11. Această Recomandare este adresată Statelor Membre, dar are ca obiectiv să fie şi un instrument de încurajare a dialogului social, precum şi a dialogului între cercetători, donori şi societate, în ansamblul său.

12. Pe cât posibil, până la 15 decembrie 2005 iar apoi anual, Statele Membre sunt invitate să informeze Comisia cu privire la orice măsuri pe care le-au adoptat ca urmare a acestei recomandări şi cu privire la primele rezultate ale aplicării acesteia, dar şi să ofere exemple de bune practici.

13. Această Recomandare va fi revizuită periodic de către Comisie în contextul Metodei deschise de coordonare.

Elaborat la Bruxelles,
Pentru Comisie
Janez POTOCNIK
Membru al Comisiei

ANEXĂ

SECȚIUNEA 1: CARTA EUROPEANĂ A CERCETĂTORILOR

Carta Europeană a Cercetătorilor este un set de principii şi de condiții generale care specifică rolurile, responsabilitățile şi drepturile atât ale cercetătorilor, cât şi ale angajatorilor şi/ sau sponsorilor cercetătorilor[6]. Scopul acestei Carte este acela de a se asigura că natura relației dintre cercetători şi angajatori sau sponsori conduce la o activitate de succes în generarea, transferul şi distribuirea de cunoştințe şi de dezvoltare tehnologică şi la dezvoltarea carierei cercetătorilor. De asemenea, Carta recunoaşte valoarea tuturor formelor de mobilitate ca instrumente pentru susținerea evoluției profesionale a cercetătorilor.

În acest sens, Carta constituie un cadru pentru cercetători, angajatori şi sponsori, care îi invită să acționeze responsabil şi ca profesioniști la locul lor de muncă şi să se recunoască reciproc în această calitate.

Carta se adresează tuturor cercetătorilor din Uniunea European în toate fazele de carieră şi acoperă toate domeniile de cercetare din sectorul public şi privat, indiferent de natura angajării[7], de statutul legal al angajatorului sau de tipul de organizație sau instituție în care aceştia îşi desfăşoară activitatea. Documentul consideră rolurile multiple pe care le au cercetătorii, care sunt desemnați nu numai să realizeze cercetarea, ci au şi atribuții ca supraveghetori, mentori, manageri sau atribuții administrative.

La fundamentul acestei Carte se află principiul că atât cercetătorii, cât şi angajatorii şi/ sau sponsorii au obligația de a se asigura că îndeplinesc condițiile legislației naționale sau regionale, proprii. Acolo unde cercetătorii se bucură de un statut şi de drepturi care, într-un anume sens, sunt mai favorabile decât cele prevăzute de această Cartă, termenii acesteia nu vor fi invocați pentru a se diminua statutul sau drepturile dobândite deja.

Atât cercetătorii, cât şi angajatorii şi sponsorii care aderă la Cartă vor respecta, de asemenea, drepturile fundamentale şi principiile recunoscute de către Carta Drepturilor Fundamentale ale Uniunii Europene[8]

Principiile şi Condițiile Generale, aplicabile Cercetătorilor:

Libertatea de cercetare

Cercetătorii trebuie să îşi concentreze activitatea pentru binele omenirii şi pentru extinderea frontierelor cunoaşterii ştiințifice, dar, în acelaşi timp, se bucură de libertatea de gîndire şi de exprimare şi de

[6] A se citi definiția de la SECȚIUNEA 3.
[7] A se citi definiția de la SECȚIUNEA 3.
[8] Monitorul Oficial C 364, 18.12.2000 p. 0001-0022

libertatea de a identifica metode prin care să se rezolve probleme, în conformitate cu principiile şi practicile de etică, recunoscute.

Cu toate acestea, cercetătorii trebuie să recunoască limitele acestei libertăți care rezultă din circumstanțe speciale de cercetare (inclusiv supraveghere/ ghidare/ management) sau din constrângeri operaționale, de exemplu: motive bugetare sau de infrastructură, sau, în special în sectorul industrial, din motive de protecție a proprietății intelectuale. Astfel de limitări nu trebuie, totuşi, să contravină principiilor şi practicilor etice, recunoscute, la care trebuie să adere cercetătorii.

Principii etice

Cercetătorii trebuie să adere la practicile etice recunoscute şi principiile fundamentale ale eticii, corespunzătoare disciplinei lor (disciplinelor lor), precum şi la standardele de etică, existente în diferitele Coduri de Etică naționale, sectoriale sau instituționale.

Responsabilitatea profesională

Cercetătorii trebuie să facă toate eforturile necesare pentru a se asigura că activitatea lor este relevantă pentru societate şi că nu dublează cercetările realizate anterior, în altă parte.

Ei trebuie să evite plagiatul de orice tip, să respecte principiul proprietății intelectuale şi proprietatea comună a datelor în cazul cercetărilor realizate în colaborare cu un supraveghetor(i) şi/ sau cu alți cercetători. Necesitatea de validare a unor descoperiri noi prin prezentarea faptului că experimentele se pot reproduce nu trebuie interpretată ca plagiat, cu condiția ca datele să fie confirmate şi citate explicit.

Dacă un aspect al activității este delegat, cercetătorii trebuie să se asigure că persoana căreia îi este atribuit are competența să îl realizeze.

Atitudinea profesională

Cercetătorii trebuie să fie familiarizați cu obiectivele strategice care guvernează domeniul lor de cercetare şi cu mecanismele de finanțare. Ei trebuie să obțină toate aprobările necesare înainte să-şi înceapă activitatea sau să acceseze resursele oferite.

Ei trebuie să-şi informeze angajatorii, sponsorii sau supraveghetorii atunci când proiectul lor de cercetare este în întârziere, este redefinit sau este încheiat sau să notifice în cazul în care acesta este terminat mai devreme decât termenul prevăzut sau dacă se suspendă din diverse motive.

Obligații contractuale şi legale

Cercetătorii de la toate nivelele trebuie să fie familiarizați cu reglementările la nivel național, sectorial sau instituțional care guvernează condițiile de formare profesională sau de activitate. Aceasta include reglementările privind drepturile de proprietate intelectuală şi solicitările şi condițiile cerute de sponsori, indiferent de natura contractului lor. Cercetătorii trebuie să respecte astfel de reglementări, prin

oferirea rezultatelor solicitate (ex: teze, publicații, patente, rapoarte, dezvoltarea de noi produse etc.) aşa cum sunt acestea stabilite în termenii şi condițiile contractului sau documentului echivalent.

Responsabilitate

Cercetătorii trebuie să fie conştienți că sunt răspunzători în fața angajatorilor lor, sponsorilor lor sau a altor instituții publice sau private, precum şi, din motive de etică, în fața societății ca tot. În particular, cercetătorii finanțați din fonduri publice sunt, de asemenea, răspunzători pentru utilizarea eficientă a banilor contribuabililor. Prin urmare, ei trebuie să respecte principiile unui management financiar corect, transparent şi eficient şi să coopereze cu organismele de audit autorizate să le verifice activitatea, indiferent dacă acestea au fost desemnate de către angajatori / sponsori sau de către comitetele de etică. Metodele de colectare şi analiză, rezultatele şi, acolo unde este posibil detalii privind datele activității trebuie să fie deschise verificării externe şi interne, ori de câte ori este necesar şi la solicitarea autorităților competente.

Buna practică în cercetare

Permanent, cercetătorii trebuie să adopte practici de lucru sigure, în conformitate cu legislația națională, inclusiv să ia măsurile necesare pentru protejarea sănătății şi pentru siguranță, precum şi pentru recuperarea după dezastre ale tehnologiei informaționale, de exemplu prin pregătirea unor strategii corespunzătoare de recuperare. De asemenea, ei trebuie să fie familiarizați cu legislația națională referitoare la protecția datelor şi la cerințele privind protecția confidențialității şi să întreprindă demersurile necesare de aplicare permanentă a acestora.

Distribuția, exploatarea rezultatelor

În conformitate cu obligațiile lor contractuale, toți cercetătorii trebuie să se asigure că rezultatele cercetării lor sunt distribuite şi exploatate, de exemplu: comunicate, transferate într-o altă cercetare sau, dacă este posibil, comercializate. În special, cercetătorii principali se aşteaptă să preia conducerea în a se asigura de faptul că cercetarea este de succes şi că rezultatele sunt fie exploatate comercial, fie făcute accesibile publicului (sau ambele) ori de câte ori apare o astfel de oportunitate.

Angajamentul public

Cercetătorii trebuie să se asigure că activitățile lor de cercetare sunt cunoscute în ansamblul societății într-un astfel de mod încât ele să fie înțelese de profani (nespecialişti), prin aceasta ameliorându-se înțelegerea ştiinței de către public. Un angajament direct cu publicul îi va ajuta pe cercetători să înțeleagă mai bine interesul public pentru prioritățile ştiințifice şi tehnologice, dar şi anxietatea publicului față de anumite domenii.

Relația cu supraveghetorii

În etapa de formare, cercetătorii trebuie să stabilească o relație structurată şi periodică cu supraveghetorul (supraveghetorii) lor şi cu reprezentantul (reprezentanții) facultății/ departamentului, astfel încât să beneficieze din plin de această relație.

Aceasta include păstrarea evidențelor tuturor etapelor de lucru şi ale tuturor descoperirilor de cercetare, obținerea de feed-back prin intermediul rapoartelor şi seminarelor, aplicarea acestuia şi desfăşurarea unei activități în conformitate cu termenele şi calendarele convenite, care să se concretizeze în rezultate.

Îndatoriri de supraveghere şi manageriale

Cercetătorii principali trebuie să acorde o atenție specială rolului lor multiplu de: supraveghetori, mentori, consilieri de carieră, lideri, coordonatori de proiect, manageri sau comunicatori ştiințifici.

Ei trebuie să îndeplinească aceste îndatoriri la standardele profesionale cele mai înalte. Referitor la rolul de supraveghetori sau de mentori ai cercetătorilor, cercetătorii principali trebuie să construiască o relație constructivă şi pozitivă cu cercetătorii debutanți, astfel încât să creeze condițiile unui transfer eficient de cunoştințe şi să realizeze o evoluție de succes a carierei acestora.

Dezvoltarea profesională continuă

Cercetătorii din toate stadiile carierei trebuie să caute să-şi îmbunătățească permanent activitatea prin actualizarea şi extinderea aptitudinilor şi competențelor lor. Aceasta se poate realiza foarte divers, dar nu se poate restrânge doar la formarea profesională formală, ateliere, conferințe şi e-educație.

Principii şi Condiții Generale aplicabile angajatorilor şi sponsorilor:

Recunoaşterea profesiei

Toți cercetătorii angajați într-o carieră de cercetare trebuie să fie recunoscuți drept profesionişit şi să fie tratați ca atare. Aceasta trebuie să înceapă încă de la începutul carierei, în special la nivel post-universitar şi trebuie să includă toate nivelele, indiferent de clasificarea lor la nivel național (de exemplu; angajat, absolvent, candidat la doctorat, post-doctorat, funcționari publici).

Nediscriminare

Angajatorii şi/ sau sponsorii cercetătorilor nu vor face nici un fel de discriminări pe bază de sex, vârstă, etnie, origine națională sau socială, religie sau convingeri ideologice, orientare sexuală, limbă, handicap, opinii politice, condiții economice sau sociale.

Mediul de cercetare

Angajatorii şi/ sau sponsorii cercetătorilor trebuie să se asigure că este creat cel mai stimulativ mediu de cercetare sau de formare în domeniu, care oferă echipamentele, facilitățile şi oportunitățile corespunzătoare, inclusiv pentru colaborarea la distanță cu alte rețele de cercetare şi că sunt respectate reglementările naționale sau sectoriale privind protecția sănătății şi a siguranței în cercetare. Sponsorii trebuie să se asigure că sunt alocate resursele corespunzătoare pentru programul de lucru convenit.

Condiții de lucru

Angajatorii şi/ sau sponsorii trebuie să se asigure că cercetătorilor, inclusiv cercetătorilor cu dizabilităţi, condiţiile de lucru oferite prezintă, acolo unde este posibil, flexibilitatea considerată necesară pentru realizarea unei cercetări de succes, în conformitate cu legislaţia naţională existentă şi cu prevederile contractelor colective de muncă la nivel naţional sau sectorial. Ei trebuie să aibă ca obiectiv să ofere condiţii de lucru care să permită atât cercetătoarelor, cât şi cercetătorilor să combine activitatea profesională cu viaţa de familie, copiii cu cariera[9]. Între altele, trebuie acordată o atenţie specială programului flexibil de lucru, activităţii part-time, activităţii la domiciliu şi concediului de sărbători, precum şi prevederilor financiare şi administrative necesare, care reglementează acest tip de aranjamente.

Stabilitatea şi permanenţa angajării

Angajatorii şi/ sau sponsorii trebuie să se asigure că performanţa activităţii derulate de cercetători nu este subminată de instabilitatea contractelor de muncă şi, în consecinţă, trebuie să se angajeze cât de mult posibil în îmbunătăţirea stabilităţii condiţiilor de angajare pentru cercetători, astfel implementând şi respectând principiile şi termenii *Directivei UE privind Activitatea pe durată determinată*[10].

Finanţare şi salarii

Angajatorii şi/ sau sponsorii cercetătorilor trebuie să se asigure că aceştia se bucură de condiţii corecte şi atractive de finanţare şi/ sau de salarii cu prevederi echitabile de asigurări sociale (inclusiv pentru caz de boală, pentru maternitate, dreptul la pensie şi asigurarea de şomaj), în conformitate cu prevederile legislaţiei naţionale din domeniu şi cu cele din contractele colective de muncă la nivel naţional sau de ramură. Aceste condiţii se referă la cercetătorii din toate categoriile, inclusiv la debutanţi şi ele trebuie să fie proporţionale cu statutul lor juridic, performanţa şi nivelul de calificare şi/ sau responsabilităţi.

Egalitatea de şanse[11]

Angajatorii şi/ sau sponsorii trebuie să aibă în vedere egalitatea de şanse pentru toate categoriile de personal, inclusiv la nivel de supraveghere şi la cel managerial. Aceasta se poate dobândi pe baza unei politici de şanse egale atât la recrutare, cât şi în toate etapele carierei fără, însă, ca aceasta să prevaleze

[9] A se citi SEC (2005) 260, Femeile şi Ştiinţa: Excelenţă şi Inovaţie – Egalitatea de şanse în ştiinţă.

[10] **Care are ca scop să prevină ca angajaţii pe durată determinată să fie trataţi mai puţin favorabili decât cei aflaţi în posturi similare dar cu contract de muncă pe perioadă nedeterminată, să prevină abuzul care apare din utilizarea succesivă a contractelor pe perioadă determinată, să îmbunătăţească accesul acestei categorii de angajaţi la cursuri de formare profesională şi să se asigure că angajaţii pe durată determinată sunt informaţi cu privire la posturile permanente vacante. Directiva Consiliului 1999/70/EC referitoare la "Acordul Cadru privind activitatea pe perioadă determinată" încheiat de CES, UNICE şi CEEP, adoptat în data de 28 iunie 1999.**

[11] A se citi SEC (2005) 260, Femeile şi Ştiinţa: Excelenţă şi Inovaţie – Egalitatea de şanse în ştiinţă.

criteriile de calitate şi competenţă. Pentru a se asigura un tratament egal, comitetele de selecţie şi evaluarea trebuie să fie formate corespunzător, pe sexe.

Evoluţia carierei

Angajatorii şi/ sau sponsorii cercetătorilor trebuie să elaboreze, preferabil în cadrul managementului propriu al resurselor umane, o strategie de evoluţie a carierei pentru toate categoriile de cercetători, indiferent de situaţia lor contractuală, inclusiv pentru cercetătorii cu contracte pe durată determinată. Strategia trebuie să includă disponibilitatea mentorilor implicaţi în oferirea de sprijin şi de consultanţă pentru evoluţia personală şi profesională a cercetătorilor, astfel motivându-i pe aceştia şi contribuind la reducerea nesiguranţei privind viitorul lor profesional. Toţi cercetării trebuie să fie familiarizaţi cu astfel de prevederi şi de aranjamente.

Valoarea mobilităţii

Angajatorii şi/ sau sponsorii trebuie să recunoască valoarea mobilităţii geografice, inter-sectoriale, inter şi trans-disciplinare şi virtuale[12], precum şi pe cea a mobilităţii între sectorul public şi cel privat drept căi importante de creştere a cunoştinţelor ştiinţifice şi profesionale pentru fiecare etapă a carierei cercetătorului. În concluzie, ei trebuie să creeze acest fel de opţiuni în strategia de evoluţie a carierei şi să recunoacă integral şi să valorifice orice tip de mobilitate în cadrul sistemului propriu de evoluţie/ evaluare a carierei.

De asemenea, aceasta solicită implementare instrumentelor administrative necesare care să permită utilizarea granturilor şi a prevederilor de securitate socială, în conformitate cu legislaţia naţională.

Accesul la formarea profesională în cercetare şi la dezvoltarea continuă

Angajatorii şi/ sau sponsorii trebuie să se asigure că tuturor categoriile de cercetători, indiferent de situaţia lor contractuală, li se oferă oportunităţi de evoluţie profesională şi ameliorare a posibilităţii lor de angajare prin accesul la măsuri de dezvoltare continuă a aptitudinilor şi competenţelor lor.

Astfel de măsuri trebuie evaluate periodic pe criterii de accesibilitate, utilizare şi eficienţă în ameliorarea competenţelor, aptitudinilor şi a gradului de ocupare a forţei de muncă.

Accesul la consultanţa pentru carieră

Angajatorii şi/ sau sponsorii trebuie să se asigure că, indiferent de situaţia lor contractuală, tuturor categoriilor de cercetători le este oferită consultanţă pentru carieră şi asistenţă pentru ocuparea unui loc de muncă, fie în cadrul instituţiilor implicate, fie prin colaborare cu alte structuri.

Drepturile de proprietate intelectuală

Angajatorii şi/ sau sponsorii trebuie să se asigure că toate categoriile de cercetători se bucură de beneficiile rezultate din exploatarea (dacă există) rezultatelor activităţii lor de Cercetare-Dezvoltate prin

[12] De exemplu colaborarea la distanţă prin reţelele electronice.

instrumentul protecției legale şi, în special, prin protecția corespunzătoare a Drepturilor de proprietate intelectuală, inclusiv a copyright.

Politicile şi practicile trebuie să specifice ce drepturi revin cercetătorilor şi/sau, acolo unde este cazul, ce drepturi revin angajatorilor sau terților, inclusiv organizațiilor comerciale sau industriale, iar, pe cât posibil, acestea să fie prevăzute în contractele specifice de colaborare sau în alte tipuri de contracte.

Drepturile de coautor

Dreptul de coautor trebuie considerat ca un aspect pozitiv de către instituții atunci când se realizează evaluarea personalului, ca dovadă a unei abordări constructive în realizarea activității de cercetare. În concluzie, angajatorii şi/ sau sponsorii trebuie să elaboreze strategii, practici şi proceduri prin care tuturor categoriilor de cercetători să li se condițiile cadru necesare pentru a se bucura de dreptul de a fi recunoscuți, înregistrați şi/ sau citați, în contextul contribuțiilor lor reale, drept coautori ai documentelor, invențiilor, etc sau dreptul de a-şi publica rezultatele cercetării proprii, independent de supraveghetorul (supraveghetorii) lor.

Supraveghere

Angajatorii şi/ sau sponsorii trebuie să se asigure că există o persoană identificată la care să poată apela cercetătorii debutanți pentru îndeplinirea îndatoririlor lor profesionale şi trebuie să informeze cercetătorii cu privire la aceasta.

Astfel de aranjamente trebuie să definească clar faptul că supraveghetorii propuşi au expertiza profesională necesară pentru acest tip de activitate, au timpul, cunoştințele, experiența şi expertiza necesare pentru a o realiza şi sunt apți să ofere cercetătorului debutant sprijinul corespunzător. De asemenea, ei trebuie să dispună de procedurile necesare de monitorizare a evoluțiilor, precum şi d mecanismele de feed-back, aferente.

Predarea

Predarea reprezintă o cale esențială pentru structurarea şi diseminarea cunoştințelor şi, în concluzie, trebuie considerată drept o opțiune de valoare în traseul carierei cercetătorilor. Cu toate acestea, responsabilitățile de predare nu trebuie să fie excesive şi nu trebuie să îi împiedice pe cercetători sî-şi realizeze activitățile de cercetare, în special la începutul carierei.

Angajatorii şi/ sau sponsorii trebuie să se asigure că îndatoririle de predare sunt remunerate corespunzător şi să fie luate în considerare în sistemele de evaluare/ apreciere, precum şi că timpul dedicat, de către personalul cu vechime, formării cercetătorilor debutanți este cuantificat ca parte a acestor atribuții. Se va oferi o pregătire corespunzătoare pentru activitățile de predare şi educare ca parte a evoluției profesionale a cercetătorilor.

Sistemele de evaluare/ apreciere

Pentru toate categoriile de cercetători, inclusiv pentru cercetătorii principali, angajatorii şi/ sau sponsorii trebuie să introducă sisteme de evaluare/ apreciere pentru evaluarea periodică a performanței lor profesionale, care să se realizeze într-o manieră transparentă de către un comitet independent (iar, pentru cercetătorii principali, este preferabil ca evaluarea să se realizeze de către un comitet internațional).

Astfel de proceduri de evaluare şi apreciere trebuie să ia în considerare activitatea globală de cercetare şi rezultatele acesteia. De exemplu: publicații, invenții, managementul cercetării, predare/ lectori, supraveghere, mentor, colaborare națională sau internațională, atribuții administrative, activități de informare a publicului şi mobilitate trebuie luate în considerare în contextul evoluției carierei.

Sesizări/reclamații

În conformitate cu reglementările naționale, angajatorii şi/ sau sponsorii cercetătorilor trebuie să stabilească procedurile corespunzătoare de analiză a sesizărilor/ reclamațiilor cercetătorilor, inclusiv a celor referitoare la conflictele dintre supraveghetor(i) şi debutanți, posibil în persoana unui reprezentant independent (de tipul avocatului poporului). Astfel de proceduri trebuie să ofere tuturor categoriilor de personal din cercetare asistență confidențială şi informală pentru rezolvarea conflictelor legate de activitate, a disputelor şi amenințărilor, având ca scop promovarea unui tratament corect şi echitabil în cadrul instituției şi ameliorarea calității mediului de lucru, în ansamblu.

Participarea în organismele de luare a deciziilor

Angajatorii şi/ sau sponsorii cercetătorilor trebuie să recunoască drept legitim şi de dorit ca cercetătorii să fie reprezentați în organismele relevante de informare, consultare şi luare a deciziilor din cadrul instituțiilor în care îşi desfăşoară activitatea, astfel încât să le fie protejate şi promovate interesele individuale şi colective ca profesionişti şi să contribuie activ la activitatea instituțiilor lor[13].

Recrutare

Angajatorii şi/ sau sponsorii trebuie să se asigure că standardele de intrare şi admitere pentru cercetători, în special la începutul carierei, sunt clar specificate şi, de asemenea, trebuie să faciliteze accesul grupurilor dezavantajate sau al cercetătorilor care se întorc la o carieră de cercetare, inclusiv a profesorilor (de orice grad) care se întorc în cercetare.

Angajatorii şi/ sau sponsorii trebuie să respecte principiile expuse în Codul de conduită pentru recrutarea cercetătorilor atunci când numesc sau recrutează astfel de personal.

[13] De asemenea, a se vedea pentru acest context Directiva UE 2002/14/EC

SECȚIUNEA 2: CODUL DE CONDUITĂ PENTRU RECRUTAREA CERCETĂTORILOR

Codul de conduită pentru recrutarea cercetătorilor constă într-un set de principii şi condiţii generale care trebuie urmate de către angajatori şi/ sau sponsori atunci când numesc sau recrutează cercetători. Aceste principii şi condiţii trebuie să asigure respectarea valorillor de tipul transparenței procesului de recrutare şi a tratamentului egal pentru toți solicitanții, în special avându-se în vedere dezvoltarea unei piețe europene atractive, deschise şi sustenabile. Aceste principii şi condiţii sunt complementare celor expuse în Carta europeană a cercetătorilor. Instituțiile şi angajatorii care aderă la Codul de Coduită îşi vor demonstra evident angajamentul de a acționa responsabil şi respectabil şi de a oferi condiţii cadru oneste cercetătorilor, cu intenția clară de a contribui la progresul Spațiului european pentru cercetare.

Principii şi Condiţii generale ale Codului de Conduită

Recrutare

Angajatorii şi/ sau sponsorii trebuie să stabilească proceduri de recrutare care să fie deschise[14], transparente, de susținere şi comparabile la nivel internațional, dar şi structurate pe tipul de posturi anunțate.

Anunțurile trebuie să ofere o descriere amplă a cunoştințelor şi competențelor solicitate şi să nu fie atât de specializate încât să descurajeze solicitanții potriviți. Angajatorii trebuie să includă o descriere a condițiilor de lucru şi a drepturilor care se oferă, inclusiv a posibilităților de evoluție a carierei. Mai mult, perioada de timp alocată între anunțarea postului vacant sau solicitarea de oferte şi termenul limită de depunere a ofertelor trebuie să fie realist.

Selecția

Comitetele de selecție trebuie să combină expertiza diversă şi competențele şi trebuie să fie echilibrate pe sexe, precum şi, acolo unde este cazul şi este posibil, să includă membri din sectoare (public şi privat) şi discipline diverse, inclusiv reprezentanți din alte țări şi cu experiență relevantă pentru evaluarea candidatului. Oricând este posibil, trebuie utilizată o diversitate de practici de selectare, cum ar fi evaluarea externă de expertiză şi interviul.

Membrii comitetului de selecție trebuie să fie pregătiți în conformitate.

Transparența

Înainte de selectare, candidații trebuie să fie informați cu privire la procesul de recrutare şi la criteriile de selecție, la numărul de posturi vacante şi la posibilitățile de evoluție a carierei.

[14] Trebuie utilizate toate instrumentele valabile, în special la resursele accesibile pe internet, la nivel global sau internațional, de tipul Portalul pan-european al mobilității cercetătorului: http://europa.eu.int/eracareers.

De asemenea, după terminarea procesului de selecție, ei trebuie să fie informați cu privire la aspectele pozitive şi la deficiențele cererilor lor de angajare.

Evaluarea meritului

Procesul de selecție trebuie să ia în considerare toată experiența[15] acumulată de candidați. De asemenea, trebuie luate în considerare creativitatea şi nivelul de experiență al candidaților, în acelaşi timp accentul punându-se pe potențialul lor ca cercetători.

Aceasta înseamnă că meritul trebuie judecat atât calitativ, cât şi cantitativ, concentrându-se pe rezultatele de excepție obținute în cadrul unei cariere diversificate şi nu numai pe numărul de publicații. În concluzie, importanța indicilor bibliometrici trebuie echilibrată corespunzător cu o varietate mai mare de criterii de evaluare, cum ar fi predarea, supravegherea, lucrul în echipă, transferul de cunoştințe, managementul cercetării şi inovării, precum şi activitățile de informare a publicului.

Pentru candidații provenind din mediul industrial, se acordă o atenție specială oricărei contribuții la patente, dezvoltare sau invenții.

Variații în ordinea cronologică a CV-urilor

Întreruperile sau variațiile carierei în ordinea cronologică a CV-urilor nu trebuie sancționate. Trebuie considerate drept o evoluție profesională şi, în consecință, drept o potențială contribuție valoroasă la evoluția profesională a cercetătorilor către un traseu multidimensional al carierei.

În consecință, candidaților trebuie să li se permită să depună CV-uri fundamentate pe documente, care să reflecte o varietate reprezentativă de realizări şi calificări, conforme cu postul pentru care este depusă cererea de angajare.

Recunoaşterea experienței dobândite prin mobilitate

Orice experiență dobândită prin mobilitate, de exemplu stagiu în altă țară/ regiune sau în altă structură de cercetare (publică sau privată) sau schimbarea de la o disciplină sau un sector la altul, fie ca parte din formarea inițială în cercetare, fie într-o altă etapă a carierei de cercetare, sau experiența dobândită prin mobilitatea virtuală trebuie considerate ca o contribuție valoroasă la evoluția profesională a cercetătorului.

Recunoaşterea calificărilor

Angajatorii şi/ sau sponsorii trebuie să ofere o apreciere şi evaluare corespunzătoarea a calificărilor academice şi profesionale, inclusiv a calificărilor ne-formale, pentru toate categoriile de cercetători, în

[15] De asemenea, a se citi şi Carta europeană a cercetătorilor: Sistemele de evaluare/ apreciere de la SECȚIUNEA 1 din acest document.

special în contextul mobilității internaționale şi profesionale. Ei trebuie să se informeze şi să dobândească o înțelegere deplină a regulilor, procedurilor şi standardelor care reglementează recunoaşterea unor astfel de calificări şi, în consecință, să studieze legislația națională în vigoare, convențiile şi reglementările specifice privind recunoaşterea acestor calificări pe toate canalele posibile[16].

Vechimea în activitate

Nivelele de calificare solicitate trebuie să fie armonizate cu necesitățile postului şi nu să fie ca nişte bariere pentru intrarea în funcția respectivă. Recunoaşterea şi evaluarea calificărilor trebuie să se concentreze mai mult pe aprecierea rezultatelor persoanei şi nu atât pe circumstanțele sau pe reputația pe care o are persoana respectivă la instituția de la care a obținut calificările. Deoarece calificările profesionale se pot obține într-o etapă timpurie a unei cariere lungi, modelul unei evoluții profesionale pe toată durata vieții trebuie, de asemenea, recunoscut.

Numiri post-doctorat

Reguli clare şi ghiduri explicite pentru recrutarea şi numirea de cercetători post-doctoranzi, inclusiv durata maximă şi obiectivele unor astfel de numiri, trebuie stabilite de către instituțiile care numesc cercetători post-doctoranzi. Astfel de reguli trebuie să ia în considerare timpul petrecut în posturile anterioare perioadei post-doctorat la alte instituții şi faptul că statutul de post-doctorat trebuie să fie tranzitoriu, având ca obiectiv principal oferirea de oportunități suplimentare de evoluție profesională pentru o carieră în cercetare, proiectată pe termen lung.

[16] A se citi la http://www.enic-naric.net/ pentru obținerea de informații mai ample referitoare la Rețeaua NARIC (Centrele de Informare privind Recunoaşterea Academică Națională) şi la Rețeaua ENIC (Rețeaua Europeană a Centrelor de Informare).

SECȚIUNEA 3: DEFINIȚII

Cercetători

Pentru obiectivul acestei Recomandări, va fi utilizată definiția Frascati pentru cercetare[17], acceptată la nivel internațional. În consecință, cercetătorii sunt descrişi drept:

"Profesioniştii angajați în conceperea sau crearea de noi cunoştințe, produse, procese, metode şi sisteme, precum şi în managementul proiectelor respective."

În sens mai specific, această Recomandare se referă la toate persoanele angajate profesionale în domeniul Cercetării-Proiectării, pentru toate categoriile[18], indiferent de clasificarea lor. Aceasta include toate activitățile referitoare la „cercetare fundamentală", „cercetare strategică", „cercetare aplicată", proiectare experimentală şi „transfer de cunoştințe", inclusiv inovație şi capacități de consultanță, supraveghere şi de predare, managementul ştiinței şi drepturile de proprietate intelectuală, exploatarea rezultatelor cercetării sau jurnalismul ştiințific.

Se face o distincție între Cercetătorul debutant şi Cercetătorul cu experiență:

• Termenul de Cercetător debutant[19] se referă la cercetătorii din primii patru ani de activitate în domeniu (echivalentul cu normă întreagă), inclusiv la perioada de formare în domeniul cercetării.

• Cercetătorii cu experiență [20] sunt definiți cercetătorii care au minim 4 ani de experiență în domeniu (echivalentul cu normă întreagă) de la obținerea diplomei universitare care le-a acordat acces la studii de doctorat, în țara în care gradul/ diploma a fost obținută sau la cercetătorii care au deja doctoratul, indiferent de timpul petrecut pentru obținerea lui.

Angajatori

În contextul prezentei Recomandări, „angajatori" se referă la toate acele instituții din sectorul public sau privat care angajează cercetători, fie pe bază de contract, fie îi primesc pe baza altor tipuri de contracte sau aranjamente, inclusiv acele cu care nu au o relație financiară directă. Ultima parte se referă, în special, la instituțiile de învățământ superior, secțiile facultăților, laboratoare, fundații sau organisme private în care cercetătorii fie îşi continuă formarea în domeniul cercetării, fie îşi realizează activitățile de cercetare pe baza fondurilor alocate de terți.

Sponsori

[17] În: Practică standard propusă pentru studii privind cercetarea şi proiectarea experimentală, Manualul Frascati, OECD, 2002.
[18] COM (2003) 436 din 18.7. 2003: Cercetătorii din Spațiul european pentru cercetare: O profesie, mai multe cariere.
[19] A se citi Programul de lucru ce structurea resursele umane din Spațiul european pentru cercetare şi Acțiunile de mobilitate Marie Curie, ediția septembrie 2004, pag. 41.
[20] Idem, pag. 42.

"Sponsori" se referă la toate acele organisme[21] care oferă finanțare (inclusiv stipendii, premii, granturi şi burse) institutelor de cercetare publice şi private, inclusiv institutelor de învățământ superior. În această calitate, ele pot stipula ca o condiție de bază pentru alocarea de resurse ca instituțiile finanțate să dețină şi să aplice strategii, practici şi mecanisme, în conformitate cu principiile şi condițiile generale prezentate în această Recomandare.

Numire sau angajare

Aceasta se referă la orice tip de contract sau stipendiu sau bursă, grant sau premii finanțate de terți, inclusiv finanțate în contextul Programului (Programelor) Cadru[22].

[21] Comunitatea va face demersurile necesare pentru aplicarea angajamentelor expuse în prezenta Recomandare de către beneficiarul finanțării în contextul Programului (Programelor) Cadru pentru activitățile de cercetare, dezvoltare tehnologică şi demonstrație.

[22] Programului (Programelor) Cadru pentru activitățile de cercetare, dezvoltare tehnologică şi demonstrație.

EUROPEAN COMMISSION

Community research

The European Charter for Researchers

The Code of Conduct for the Recruitment of Researchers

www.europa.eu.int/eracareers/europeancharter

EUR 21620

EUROPEAN RESEARCH AREA

HUMAN RESOURCES AND MOBILITY

Interested in European research?

RTD info is our quarterly magazine keeping you in touch with main developments (results, programmes, events, etc). It is available in English, French and German. A free sample copy or free subscription can be obtained from:

European Commission
Directorate-General for Research
Information and Communication Unit
B-1049 Brussels
Fax: (32-2) 29-58220
E-mail: research@cec.eu.int
Internet: http://europa.eu.int/comm/research/rtdinfo/index_en.html

EUROPEAN COMMISSION

Directorate-General for Research
Directorate The human factor, mobility and Marie Curie activities
Unit D1 – Sector Researchers' careers

E-mail: sieglinde.gruber@cec.eu.int

Contact: Sieglinde Gruber

European Commission
Office SDME 03/51
B-1049 Brussels

Tel. (32-2) 29-84342
Fax (32-2) 29-99079

EUROPEAN COMMISSION

The European Charter for Researchers

The Code of Conduct for the Recruitment of Researchers

2005

Directorate-General for Research
Human resources and mobility (Marie Curie Actions)

EUR 21620

Europe Direct is a service to help you find answers to your questions about the European Union

Freephone number:

00 800 6 7 8 9 10 11

LEGAL NOTICE:

Neither the European Commission nor any person acting on behalf of the Commission is responsible for the use which might be made of the following information.

A great deal of additional information on the European Union is available on the Internet. It can be accessed through the Europa server (http://europa.eu.int).

Cataloguing data can be found at the end of this publication.

Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2005

ISBN 92-894-9311-9

© European Communities, 2005
Reproduction is authorised provided the source is acknowledged.

Printed in Belgium

PRINTED ON WHITE CHLORINE-FREE PAPER

Commission Recommendation of 11 March 2005 on the European Charter for Researchers and on a Code of Conduct for the Recruitment of Researchers

The Commission of the European Communities

Having regard to the Treaty establishing the European Community, and in particular Article 165 thereof

Whereas

(1) The Commission considered it necessary in January 2000 [1] to establish the European Research Area as the linchpin of the Community's future action in this field with a view to consolidating and giving structure to a European research policy.

(2) The Lisbon European Council set the Community the objective of becoming the most competitive and dynamic knowledge economy in the world by 2010.

(3) The Council has addressed issues related to the profession and the career of researchers within the European Research Area in its Resolution of 10 November 2003 [2] and welcomed in particular the Commission's intention to work towards the development of a European Researcher's Charter and a Code of Conduct for the Recruitment of Researchers.

---

1 COM(2000) 6 final of 18.1.2000.

2 JO C 282, p. 1-2, of 25.11.2003. Council Resolution of 10 November 2003 (2003/C 282/01 on the profession and the career of researchers within the European Research Area).

(4) The identified potential shortage of researchers [3], particularly in certain key disciplines, will pose a serious threat to EU's innovative strength, knowledge capacity and productivity growth in the near future and may hamper the attainment of the Lisbon and Barcelona objectives. Consequently, Europe must dramatically improve its attractiveness to researchers and strengthen the participation of women researchers by helping to create the necessary conditions for more sustainable and appealing careers for them in R&D [4].

(5) Sufficient and well-developed human resources in R&D are the cornerstone of advancement in scientific knowledge, technological progress, enhancing the quality of life, ensuring the welfare of European citizens and contributing to Europe's competitiveness.

(6) New instruments for the career development of researchers should be introduced and implemented, thus contributing to the improvement of career prospects for researchers in Europe.

(7) Enhanced and more visible career prospects also contribute to the building of a positive public attitude towards the researchers' profession, and thereby encourage more young people to embark on careers in research.

(8) The ultimate political goal of this Recommendation is to contribute to the development of an attractive, open and sustainable European labour market for researchers, where the framework conditions allow for recruiting and retaining high quality researchers in environments conducive to effective performance and productivity.

(9) Member States should endeavour to offer researchers sustainable career development systems at all career stages, regardless of their contractual situation and of the chosen R&D career path, and they

---

[3] COM (2003) 226 final and SEC(2003) 489 of 30.4.2003.

[4] SEC (2005) 260.

should endeavour to ensure that researchers are treated as professionals and as an integral part of the institutions in which they work.

(10) Even though Member States have made considerable efforts to overcome administrative and legal obstacles to geographical and intersectoral mobility, many of these obstacles still remain.

(11) All forms of mobility should be encouraged as part of a comprehensive human resource policy in R&D at national, regional and institutional level.

(12) The value of all forms of mobility needs to be fully recognised in the career appraisal and career advancement systems for researchers, thus guaranteeing that such an experience is conducive to their professional development.

(13) The development of a consistent career and mobility policy for researchers to [5] and from the European Union should be considered with regard to the situation in developing countries and regions within and outside Europe, so that building research capacities within the European Union does not occur at the expense of less developed countries or regions.

(14) Funders or employers of researchers in their role as recruiters should be responsible for providing researchers with open, transparent and internationally comparable selection and recruitment procedures.

(15) Society should appreciate more fully the responsibilities and the professionalism that researchers demonstrate in executing their work at different stages of their careers and in their multi-faceted role as knowledge workers, leaders, project coordinators, managers, supervisors, mentors, career advisors or science communicators.

---

[5] COM(2004) 178 final of 16.3.2004.

(16) This Recommendation takes as its premise that employers or funders of researchers have an overriding obligation to ensure that they meet respective national, regional or sectoral legislation requirements.

(17) This Recommendation provides Member States, employers, funders and researchers with a valuable instrument to undertake, on a voluntary basis, further initiatives for the improvement and consolidation of researchers' career prospects in the European Union and for the creation of an open labour market for researchers.

(18) The general principles and requirements outlined in this Recommendation are the fruits of a public consultation process to which the members of the Steering Group on Human Resources and Mobility have been fully associated,

Hereby recommends:

1. That Member States endeavour to undertake the necessary steps to ensure that employers or funders of researchers develop and maintain a supportive research environment and working culture, where individuals and research groups are valued, encouraged and supported, and provided with the necessary material and intangible support to enable them to fulfil their objectives and tasks. Within this context, particular priority should be given to the organisation of working and training conditions in the early stage of the researchers' careers, as it contributes to the future choices and attractiveness of a career in R&D.

2. That Member States endeavour to take, wherever necessary, the crucial steps to ensure that employers or funders of researchers improve the recruitment methods and career evaluation/appraisal systems in order to create a more transparent, open, equal and internationally accepted system of recruitment and career development as a prerequisite for a genuine European labour market for researchers.

3. That Member States - as they formulate and adopt their strategies and systems for developing sustainable careers for researchers - take duly into account and are guided by the general principles and requirements, referred to as The European Charter for Researchers and the Code of Conduct for the Recruitment of Researchers outlined in the Annex.

4. That Member States endeavour to transpose these general principles and requirements within their area of responsibility into national regulatory frameworks or sectoral and/or institutional standards and guidelines (charters and/or codes for researchers). In so doing they should take into account the great diversity of the laws, regulations and practices which, in different countries and in different sectors, determine the path, organisation and working conditions of a career in R&D.

5. That Member States consider such general principles and requirements as an integral part of institutional quality assurance mechanisms by regarding them as a means for establishing funding criteria for national/regional funding schemes, as well as adopting them for the auditing, monitoring and evaluation processes of public bodies.

6. That Member States continue their efforts to overcome the persisting legal and administrative obstacles to mobility, including those related to intersectoral mobility and mobility between and within different functions, taking into account an enlarged European Union.

7. That Member States endeavour to ensure that researchers enjoy adequate social security coverage according to their legal status. Within this context, particular attention should be paid to the portability of pension rights, either statutory or supplementary, for researchers moving within the public and private sectors in the same country and also for those moving across borders within the European Union. Such regimes should guarantee that researchers who, in the course

of their lives, change jobs or interrupt their careers do not unduly suffer a loss of social security rights.

8. That Member States put in place the necessary monitoring structures to review this Recommendation regularly, as well as to measure the extent to which employers, funders and researchers have applied the European Charter for Researchers and the Code of Conduct for the Recruitment of Researchers.

9. That the criteria for measuring this will be established and agreed with the Member States within the context of the work undertaken by the Steering Group on Human Resources and Mobility.

10. That Member States in their role as representatives in the international organisations established at intergovernmental level take due account of this Recommendation when proposing strategies and taking decisions concerning the activities of those organisations.

11. This Recommendation is addressed to the Member States but it is also intended as an instrument to encourage social dialogue, as well as dialogue among researchers, stakeholders and society at large.

12. The Member States are invited to inform the Commission, as far as possible, by 15th December 2005 and annually thereafter of any measures they have taken further to this Recommendation, and to inform it of the first results of its application as well as to provide examples of good practice.

13. This Recommendation will be reviewed periodically by the Commission in the context of the Open Method of Coordination.

Done at Brussels, 11 March 2005

For the Commission
Janez Potočnik
Member of the Commission

ANNEX

Section 1
The European Charter for Researchers

The European Charter for Researchers is a set of general principles and requirements which specifies the roles, responsibilities and entitlements of researchers as well as of employers and/or funders of researchers [6]. The aim of the Charter is to ensure that the nature of the relationship between researchers and employers or funders is conducive to successful performance in generating, transferring, sharing and disseminating knowledge and technological development, and to the career development of researchers. The Charter also recognizes the value of all forms of mobility as a means for enhancing the professional development of researchers.

In this sense, the Charter constitutes a framework for researchers, employers and funders which invites them to act responsibly and as professionals within their working environment, and to recognise each other as such.

The Charter addresses all researchers in the European Union at all stages of their career and covers all fields of research in the public and private sectors, irrespective of the nature of the appointment or employment [7], the legal status of their employer or the type of organisation or establishment in which the work is carried out. It takes into account the multiple roles of researchers, who are appointed not only to conduct research and/or to carry out development activities but are also involved in supervision, mentoring, management or administrative tasks.

---

[6] See definition in Section 3.

[7] See definition in Section 3.

This Charter takes as its premise that researchers as well as employers and/or funders of researchers have an overriding obligation to ensure that they meet the requirements of the respective national or regional legislation. Where researchers enjoy a status and rights which are, in certain respects, more favourable than those provided for in this Charter, its terms should not be invoked to diminish the status and rights already acquired.

Researchers, as well as employers and funders, who adhere to this Charter will also be respecting the fundamental rights and observe the principles recognised by the Charter of Fundamental Rights of the European Union [8].

[8] Official Journal C 364, 18.12.2000 p. 0001-0022.

General Principles and Requirements applicable to Researchers:

Research Freedom

Researchers should focus their research for the good of mankind and for expanding the frontiers of scientific knowledge, while enjoying the freedom of thought and expression, and the freedom to identify methods by which problems are solved, according to recognised ethical principles and practices.

Researchers should, however, recognise the limitations to this freedom that could arise as a result of particular research circumstances (including supervision/guidance/management) or operational constraints, e.g. for budgetary or infrastructural reasons or, especially in the industrial sector, for reasons of intellectual property protection. Such limitations should not, however, contravene recognised ethical principles and practices, to which researchers have to adhere.

Ethical principles

Researchers should adhere to the recognised ethical practices and fundamental ethical principles appropriate to their discipline(s) as well as to ethical standards as documented in the different national, sectoral or institutional Codes of Ethics.

Professional responsibility

Researchers should make every effort to ensure that their research is relevant to society and does not duplicate research previously carried out elsewhere.

They must avoid plagiarism of any kind and abide by the principle of intellectual property and joint data ownership in the case of research carried out in collaboration with a supervisor(s) and/or other researchers. The need to validate new observations by showing that experiments are reproducible should not be interpreted as plagiarism, provided that the data to be confirmed are explicitly quoted.

Researchers should ensure, if any aspect of their work is delegated, that the person to whom it is delegated has the competence to carry it out.

Professional attitude

Researchers should be familiar with the strategic goals governing their research environment and funding mechanisms, and should seek all necessary approvals before starting their research or accessing the resources provided.

They should inform their employers, funders or supervisor when their research project is delayed, redefined or completed, or give notice if it is to be terminated earlier or suspended for whatever reason.

Contractual and legal obligations

Researchers at all levels must be familiar with the national, sectoral or institutional regulations governing training and/or working conditions. This includes Intellectual Property Rights regulations, and the requirements and conditions of any sponsor or funders, independently of the nature of their contract. Researchers should adhere to such regulations by delivering the required results (e.g. thesis, publications, patents, reports, new products development, etc) as set out in the terms and conditions of the contract or equivalent document.

Accountability

Researchers need to be aware that they are accountable towards their employers, funders or other related public or private bodies as well as, on more ethical grounds, towards society as a whole. In particular, researchers funded by public funds are also accountable for the efficient use of taxpayers' money. Consequently, they should adhere to the principles of sound, transparent and efficient financial management and co-operate with any authorised audits of their research, whether undertaken by their employers/funders or by ethics committees.

Methods of collection and analysis, the outputs and, where applicable, details of the data should be open to internal and external scrutiny, whenever necessary and as requested by the appropriate authorities.

Good practice in research

Researchers should at all times adopt safe working practices, in line with national legislation, including taking the necessary precautions for health and safety and for recovery from information technology disasters, e.g. by preparing proper back-up strategies. They should also be familiar with the current national legal requirements regarding data protection and confidentiality protection requirements, and undertake the necessary steps to fulfil them at all times.

Dissemination, exploitation of results

All researchers should ensure, in compliance with their contractual arrangements, that the results of their research are disseminated and exploited, e.g. communicated, transferred into other research settings or, if appropriate, commercialised. Senior researchers, in particular, are expected to take a lead in ensuring that research is fruitful and that results

are either exploited commercially or made accessible to the public (or both) whenever the opportunity arises.

Public engagement

Researchers should ensure that their research activities are made known to society at large in such a way that they can be understood by non-specialists, thereby improving the public's understanding of science. Direct engagement with the public will help researchers to better understand public interest in priorities for science and technology and also the public's concerns.

Relation with supervisors

Researchers in their training phase should establish a structured and regular relationship with their supervisor(s) and faculty/departmental representative(s) so as to take full advantage of their relationship with them.

This includes keeping records of all work progress and research findings, obtaining feedback by means of reports and seminars, applying such feedback and working in accordance with agreed schedules, milestones, deliverables and/or research outputs.

Supervision and managerial duties

Senior researchers should devote particular attention to their multi-faceted role as supervisors, mentors, career advisors, leaders, project coordinators, managers or science communicators. They should perform these tasks to the highest professional standards. With regard to their role as supervisors or mentors of researchers, senior researchers should build up a constructive and positive relationship with the early-stage researchers, in order to set the conditions for efficient transfer of knowledge and for the further successful development of the researchers' careers.

Continuing Professional Development

Researchers at all career stages should seek to continually improve themselves by regularly updating and expanding their skills and competencies. This may be achieved by a variety of means including, but not restricted to, formal training, workshops, conferences and e-learning.

General Principles and Requirements applicable to Employers and Funders:

Recognition of the profession

All researchers engaged in a research career should be recognised as professionals and be treated accordingly. This should commence at the beginning of their careers, namely at postgraduate level, and should include all levels, regardless of their classification at national level (e.g. employee, postgraduate student, doctoral candidate, postdoctoral fellow, civil servants).

Non-discrimination

Employers and/or funders of researchers will not discriminate against researchers in any way on the basis of gender, age, ethnic, national or social origin, religion or belief, sexual orientation, language, disability, political opinion, social or economic condition.

Research environment

Employers and/or funders of researchers should ensure that the most stimulating research or research training environment is created which offers appropriate equipment, facilities and opportunities, including for remote collaboration over research networks, and that the national or sectoral regulations concerning health and safety in research are observed. Funders should ensure that adequate resources are provided in support of the agreed work programme.

Working conditions

Employers and/or funders should ensure that the working conditions for researchers, including for disabled researchers, provide where appropriate the flexibility deemed essential for successful research performance in accordance with existing national legislation and with national or sectoral collective-bargaining agreements. They should aim to provide working conditions which allow both women and men researchers to combine family and work, children and career [9]. Particular attention should be paid, *inter alia*, to flexible working hours, part-time working, tele-working and sabbatical leave, as well as to the necessary financial and administrative provisions governing such arrangements.

Stability and permanence of employment

Employers and/or funders should ensure that the performance of researchers is not undermined by instability of employment contracts, and should therefore commit themselves as far as possible to improving the stability of employment conditions for researchers, thus implementing and abiding by the principles and terms laid down in the *EU Directive on Fixed-Term Work* [10].

---

[9] See SEC (2005) 260, Women and Science: Excellence and Innovation – Gender Equality in Science.

[10] Which aims to prevent fixed-term employees from being treated less favourably than similar permanent employees, to prevent abuse arising from the use of successive fixed-term contracts, to improve access to training for fixed-term employees and to ensure that fixed-term employees are informed about available permanent jobs. Council Directive 1999/70/EC concerning the "Framework Agreement on fixed-term work" concluded by ETUC, UNICE and CEEP, adopted on 28 June 1999.

Funding and salaries

Employers and/or funders of researchers should ensure that researchers enjoy fair and attractive conditions of funding and/or salaries with adequate and equitable social security provisions (including sickness and parental benefits, pension rights and unemployment benefits) in accordance with existing national legislation and with national or sectoral collective bargaining agreements. This must include researchers at all career stages including early-stage researchers, commensurate with their legal status, performance and level of qualifications and/or responsibilities.

Gender balance [11]

Employers and/or funders should aim for a representative gender balance at all levels of staff, including at supervisory and managerial level. This should be achieved on the basis of an equal opportunity policy at recruitment and at the subsequent career stages without, however, taking precedence over quality and competence criteria. To ensure equal treatment, selection and evaluation committees should have an adequate gender balance.

Career development

Employers and/or funders of researchers should draw up, preferably within the framework of their human resources management, a specific career development strategy for researchers at all stages of their career, regardless of their contractual situation, including for researchers on fixed-term contracts. It should include the availability of mentors involved in providing support and guidance for the personal and professional development of researchers, thus motivating them and contributing to reducing any

[11] See SEC (2005) 260, Women and Science: Excellence and Innovation – Gender Equality in Science.

insecurity in their professional future. All researchers should be made familiar with such provisions and arrangements.

Value of mobility

Employers and/or funders must recognise the value of geographical, intersectoral, inter- and trans-disciplinary and virtual [12] mobility as well as mobility between the public and private sector as an important means of enhancing scientific knowledge and professional development at any stage of a researcher's career. Consequently, they should build such options into the specific career development strategy and fully value and acknowledge any mobility experience within their career progression/appraisal system.

This also requires that the necessary administrative instruments be put in place to allow the portability of both grants and social security provisions, in accordance with national legislation.

Access to research training and continuous development

Employers and/or funders should ensure that all researchers at any stage of their career, regardless of their contractual situation, are given the opportunity for professional development and for improving their employability through access to measures for the continuing development of skills and competencies.

Such measures should be regularly assessed for their accessibility, take-up and effectiveness in improving competencies, skills and employability.

[12] i.e. remote collaboration over electronic networks.

Access to career advice

Employers and/or funders should ensure that career advice and job placement assistance, either in the institutions concerned, or through collaboration with other structures, is offered to researchers at all stages of their careers, regardless of their contractual situation.

Intellectual Property Rights

Employers and/or funders should ensure that researchers at all career stages reap the benefits of the exploitation (if any) of their R&D results through legal protection and, in particular, through appropriate protection of Intellectual Property Rights, including copyrights.

Policies and practices should specify what rights belong to researchers and/or, where applicable, to their employers or other parties, including external commercial or industrial organisations, as possibly provided for under specific collaboration agreements or other types of agreement.

Co-authorship

Co-authorship should be viewed positively by institutions when evaluating staff, as evidence of a constructive approach to the conduct of research. Employers and/or funders should therefore develop strategies, practices and procedures to provide researchers, including those at the beginning of their research careers, with the necessary framework conditions so that they can enjoy the right to be recognised and listed and/or quoted, in the context of their actual contributions, as co-authors of papers, patents, etc, or to publish their own research results independently from their supervisor(s).

Supervision

Employers and/or funders should ensure that a person is clearly identified to whom early-stage researchers can refer for the performance of their professional duties, and should inform the researchers accordingly.

Such arrangements should clearly define that the proposed supervisors are sufficiently expert in supervising research, have the time, knowledge, experience, expertise and commitment to be able to offer the research trainee appropriate support and provide for the necessary progress and review procedures, as well as the necessary feedback mechanisms.

Teaching

Teaching is an essential means for the structuring and dissemination of knowledge and should therefore be considered a valuable option within the researchers' career paths. However, teaching responsibilities should not be excessive and should not prevent researchers, particularly at the beginning of their careers, from carrying out their research activities.

Employers and/or funders should ensure that teaching duties are adequately remunerated and taken into account in the evaluation/appraisal systems, and that time devoted by senior members of staff to the training of early stage researchers should be counted as part of their teaching commitment. Suitable training should be provided for teaching and coaching activities as part of the professional development of researchers.

Evaluation/appraisal systems

Employers and/or funders should introduce for all researchers, including senior researchers, evaluation/appraisal systems for assessing their professional performance on a regular basis and in a transparent manner by an independent (and, in the case of senior researchers, preferably international) committee.

Such evaluation and appraisal procedures should take due account of their overall research creativity and research results, e.g. publications, patents, management of research, teaching/lecturing, supervision, mentoring, national or international collaboration, administrative duties, public awareness activities and mobility, and should be taken into consideration in the context of career progression.

Complaints/appeals

Employers and/or funders of researchers should establish, in compliance with national rules and regulations, appropriate procedures, possibly in the form of an impartial (ombudsman-type) person to deal with complaints/appeals of researchers, including those concerning conflicts between supervisor(s) and early-stage researchers. Such procedures should provide all research staff with confidential and informal assistance in resolving work-related conflicts, disputes and grievances, with the aim of promoting fair and equitable treatment within the institution and improving the overall quality of the working environment.

Participation in decision-making bodies

Employers and/or funders of researchers should recognise it as wholly legitimate, and indeed desirable, that researchers be represented in the relevant information, consultation and decision-making bodies of the institutions for which they work, so as to protect and promote their individual and collective interests as professionals and to actively contribute to the workings of the institution [13].

[13] In this context see also EU Directive 2002/14/EC.

Recruitment

Employers and/or funders should ensure that the entry and admission standards for researchers, particularly at the beginning at their careers, are clearly specified and should also facilitate access for disadvantaged groups or for researchers returning to a research career, including teachers (of any level) returning to a research career.

Employers and/or funders of researchers should adhere to the principles set out in the Code of Conduct for the Recruitment of Researchers when appointing or recruiting researchers.

Section 2
The Code of Conduct for the Recruitment of Researchers

The code of conduct for the recruitment of researchers consists of a set of general principles and requirements that should be followed by employers and/or funders when appointing or recruiting researchers. These principles and requirements should ensure observance of values such as transparency of the recruitment process and equal treatment of all applicants, in particular with regard to the development of an attractive, open and sustainable European labour market for researchers, and are complementary to those outlined in the European Charter for Researchers. Institutions and employers adhering to the Code of Conduct will openly demonstrate their commitment to act in a responsible and respectable way and to provide fair framework conditions to researchers, with a clear intention to contribute to the advancement of the European Research Area.

General Principles and Requirements for the Code of Conduct

Recruitment

Employers and/or funders should establish recruitment procedures which are open [14], efficient, transparent, supportive and internationally comparable, as well as tailored to the type of positions advertised.

[14] All available instruments should be used, in particular international or globally accessible web-based resources such as the pan-European Researcher's Mobility Portal: http://europa.eu.int/eracareers.

Advertisements should give a broad description of knowledge and competencies required, and should not be so specialised as to discourage suitable applicants. Employers should include a description of the working conditions and entitlements, including career development prospects. Moreover, the time allowed between the advertisement of the vacancy or the call for applications and the deadline for reply should be realistic.

Selection

Selection committees should bring together diverse expertise and competences and should have an adequate gender balance and, where appropriate and feasible, include members from different sectors (public and private) and disciplines, including from other countries and with relevant experience to assess the candidate. Whenever possible, a wide range of selection practices should be used, such as external expert assessment and face-to-face interviews. Members of selection panels should be adequately trained.

Transparency

Candidates should be informed, prior to the selection, about the recruitment process and the selection criteria, the number of available positions and the career development prospects. They should also be informed after the selection process about the strengths and weaknesses of their applications.

Judging merit

The selection process should take into consideration the whole range of experience [15] of the candidates. While focusing on their overall potential as researchers, their creativity and level of independence should also be considered.

[15] See also The European Charter for Researchers: Evaluation/Appraisal systems in Section 1 of this document.

This means that merit should be judged qualitatively as well as quantitatively, focusing on outstanding results within a diversified career path and not only on the number of publications. Consequently, the importance of bibliometric indices should be properly balanced within a wider range of evaluation criteria, such as teaching, supervision, teamwork, knowledge transfer, management of research and innovation and public awareness activities. For candidates from an industrial background, particular attention should be paid to any contributions to patents, development or inventions.

Variations in the chronological order of CVs

Career breaks or variations in the chronological order of CVs should not be penalised, but regarded as an evolution of a career, and consequently, as a potentially valuable contribution to the professional development of researchers towards a multidimensional career track. Candidates should therefore be allowed to submit evidence-based CVs, reflecting a representative array of achievements and qualifications appropriate to the post for which application is being made.

Recognition of mobility experience

Any mobility experience, e.g. a stay in another country/region or in another research setting (public or private) or a change from one discipline or sector to another, whether as part of the initial research training or at a later stage of the research career, or virtual mobility experience, should be considered as a valuable contribution to the professional development of a researcher.

Recognition of qualifications

Employers and/or funders should provide for appropriate assessment and evaluation of the academic and professional qualifications, including non-formal qualifications, of all researchers, in particular within the context of

international and professional mobility. They should inform themselves and gain a full understanding of rules, procedures and standards governing the recognition of such qualifications and, consequently, explore existing national law, conventions and specific rules on the recognition of these qualifications through all available channels [16].

Seniority

The levels of qualifications required should be in line with the needs of the position and not be set as a barrier to entry. Recognition and evaluation of qualifications should focus on judging the achievements of the person rather than his/her circumstances or the reputation of the institution where the qualifications were gained. As professional qualifications may be gained at an early stage of a long career, the pattern of lifelong professional development should also be recognised.

Postdoctoral appointments

Clear rules and explicit guidelines for the recruitment and appointment of postdoctoral researchers, including the maximum duration and the objectives of such appointments, should be established by the institutions appointing postdoctoral researchers. Such guidelines should take into account time spent in prior postdoctoral appointments at other institutions and take into consideration that the postdoctoral status should be transitional, with the primary purpose of providing additional professional development opportunities for a research career in the context of long-term career prospects.

[16] Look at http://www.enic-naric.net/ to find more detailed information about the NARIC Network (National Academic Recognition Information Centres) and the ENIC Network (European Network of Information Centres).

Section 3
Definitions

Researchers

For the purpose of this Recommendation the internationally recognised Frascati definition of research [17] will be used. Consequently, researchers are described as

"Professionals engaged in the conception or creation of new knowledge, products, processes, methods and systems, and in the management of the projects concerned."

More specifically, this Recommendation relates to all persons professionally engaged in R&D at any career stage [18], regardless of their classification. This includes any activities related to "basic research", "strategic research", "applied research", experimental development and "transfer of knowledge" including innovation and advisory, supervisory and teaching capacities, the management of knowledge and intellectual property rights, the exploitation of research results or scientific journalism.

A distinction is made between Early-Stage Researcher and Experienced Researchers:

- The term Early-Stage Researcher [19] refers to researchers in the first four years (full-time equivalent) of their research activity, including the period of research training.

---

17 In: Proposed Standard Practice for Surveys on Research and Experimental Development, Frascati Manual, OECD, 2002.

18 COM (2003) 436 of 18.7. 2003: Researchers in the ERA: One profession, multiple careers.

19 See Work Programme Structuring the European Research Area Human Resources and Mobility Marie Curie Actions, edition September 2004, page 41.

- Experienced Researchers [20] are defined as researchers having at least four years of research experience (full-time equivalent) since gaining a university diploma giving them access to doctoral studies, in the country in which the degree/diploma was obtained or researchers already in possession of a doctoral degree, regardless of the time taken to acquire it.

Employers

In the context of this Recommendation "employers" refers to all those public or private institutions which employ researchers on a contractual basis or which host them under other types of contracts or arrangements, including those without a direct financial relationship. The latter refers particularly to institutions of higher education, faculty departments, laboratories, foundations or private bodies where researchers either undergo their research training or carry out their research activities on the basis of funding provided by a third party.

Funders

"Funders" refers to all those bodies [21] which provide funding, (including stipends, awards, grants and fellowships) to public and private research institutions, including institutions for higher education. In this role they might stipulate as a key condition for providing funding that the funded institutions should have in place and apply effective strategies, practices and mechanisms according to the general principles and requirements presented in this Recommendation.

---

[20] Idem, page 42.

[21] The Community will endeavour to apply the commitments laid down in this Recommendation to the receiver of funding in the context of the Framework Programme(s) for Research, Technological Development and Demonstration Activities.

Appointment or employment

This refers to any type of contract or stipend or to a fellowship, grant or awards financed by a third party including funding within the context of the Framework Programme(s) [22].

[22] The Framework Programme(s) for Research, Technological Development and Demonstration Activities.

European Commission

EUR 21620 — The European Charter for Researchers. The Code of Conduct for the Recruitment

Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities

2005 — 32 pp. — 14.8 x 21 cm

ISBN 92-894-9311-9

SALES AND SUBSCRIPTIONS

Publications for sale produced by the Office for Official Publications of the European Communities are available from our sales agents throughout the world.

How do I set about obtaining a publication?

Once you have obtained the list of sales agents, contact the sales agent of your choice and place your order.

How do I obtain the list of sales agents?

- Go to the Publications Office website http://publications.eu.int/
- Or apply for a paper copy by fax (352) 2929 42758

KI-NA-21620-EN-C

The European Commission has adopted the European Charter for Researchers and a Code of Conduct for the Recruitment of Researchers. These two documents are key elements in the EU's policy to make research an attractive career, which is a vital feature of its strategy to stimulate economic and employment growth. The Charter and Code of Conduct will give individual researchers the same rights and obligations wherever they may work throughout the EU. This should help counter the fact that research careers in Europe are fragmented at local, regional, national or sectoral level, and allow Europe to make the most of its scientific potential.

ISBN 92-894-9311-9

Publications Office
Publications.eu.int

9 789289 493116

Denumire	Cod
Matematica	101010
Agronomie	205010
Horticultură	205020
Biotehnologii	205010B
Zootehnie	205010Z
Medicina Veterinara	304010
Medicina	303010
Biologie	301010
Informatica	101020
Fizica	102010
Chimie	103010
Inginerie chimica	103020
Geografie	104010
Geologie	104010G
Stiinta mediului	104010S
Inginerie civila si instalatii	201010
Inginerie electrica	202010
Inginerie energetica	202020
Inginerie electronica si telecomunicatii	202010IET
Inginerie geologica	203010
Inginerie geodezica	203020
Mine, petrol si gaze	203010MPG
Ingineria aerospatiala	204010
Ingineria autovehiculelor	204020
Ingineria transporturilor	204030
Inginerie forestiera	205030
Silvicultura	205040
Inginerie si management in agricultura si dezvoltare rurala	205050
Ingineria produselor alimentare	205010IPA
Claculatoare si tehnologia informatiei	206010
Ingineria sistemelor	206020
Ingineria mecanica	207010
Inginerie industriala	207010II
Inginerie navala si navigatie	207020
Stiinte ingineresti aplicate	207030

Denumire	Cod
Arhitectura navala	207040
Mecanica si robotica	207010MR
Ingineria materialelor	207010IMat
Ingineria mediului	207010IMed
inginerie si managemet	207010IMan
Inginerie genistica, Inginerie de armament, rachete si munitii	207010IG
Biochimie	302010
Medicina dentara	305010
Farmacie	306010
Drept	401010
Stiinte administrative	402010
Stiinte ale comunicarii	403010
Sociologie	404010
Relatii internationale si studii europene	405010
Stiinte politice	405020
Informatii si securitate nationala	406010
Ordine publica si siguranta nationala	406020
Stiinte militare	406030
Administrarea afacerilor	407010
Cibernetica si statistica	407010CS
Informatica economica	407020
Contabilitate	401710Conta
Economie	407010Econ
Finante	407010F
Management	407010Man
Marketing	407010Mark
Economie si afaceri internationale	407010EAI
Psihologie	408010
Stiinte ale educatiei	408010SE
Filologie	501010
Filosofie	502010
Istorie	503010
Teologie	504010

Denumire	Cod
Studii culturale	505010
Arhitectura si urbanism	506010
Urbanism	506020
Arte vizuale	507010
Istoria si teoria artei *13)	507020
Teatru si artele spectacolului	507010TAS
Cinematografie si media	507020CM
Muzica	507010M
Stiinta Sportului si Educatiei Fizice	601010
Mecatronica si robotica	207010MEC
ARHITECTURA	03

C/2023/1640

29.12.2023

RECOMANDAREA CONSILIULUI

din 18 decembrie 2023

privind un cadru european pentru atragerea și păstrarea în Europa a talentelor din domeniul cercetării, inovării și antreprenoriatului

(C/2023/1640)

CONSILIUL UNIUNII EUROPENE,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene, în special articolul 182 alineatul (5) și articolul 292 prima și a doua teză,

având în vedere propunerea Comisiei Europene,

întrucât:

(1) Recomandarea 2005/251/CE a Comisiei ([1]) a jucat un rol important în sprijinirea cercetătorilor și a carierelor în cercetare în Uniune. Carta europeană a cercetătorilor și Codul de conduită privind recrutarea cercetătorilor (denumită în continuare „Carta și Codul cercetătorilor") au devenit puncte de referință pentru cercetători, angajatori sau finanțatori ai cercetătorilor, contribuind la consolidarea Spațiului european de cercetare (SEC) și sprijinind dezvoltarea unei piețe a forței de muncă a Uniunii mai atractive, deschise și durabile pentru cercetători. Începând cu anul 2008 este instituită o procedură europeană prin care se certifică angajamentul și progresul unei instituții cu privire la punerea în aplicare a principiilor Cartei și Codului cercetătorilor, și anume Strategia în materie de resurse umane pentru cercetători (HRS4R).

(2) Comunicarea Comisiei intitulată „Agenda europeană pentru competențe în scopul promovării competitivității durabile, a echității sociale și a rezilienței", adoptată la 1 iulie 2020 ([2]), subliniază faptul că cercetătorii sunt în avangarda științei și inovării, precum și faptul că aceștia au nevoie de un ansamblu de competențe specifice pentru o carieră de succes atât în mediul academic, cât și în afara acestuia. Aceasta prevede definirea unei taxonomii a competențelor cercetătorilor pentru a permite, printre altele, monitorizarea statistică a circulației creierelor, crearea unui cadru european al competențelor pentru cercetători, precum și sprijin pentru înzestrarea cercetătorilor cu competențele necesare în vederea mobilității intersectoriale. Prima acțiune emblematică a Agendei pentru competențe, Pactul pentru competențe al Uniunii, sprijină perfecționarea și recalificarea prin colaborarea dintre industrie, furnizorii de educație sau de formare, partenerii sociali și autoritățile publice, în cadrul unor parteneriate la scară largă pentru competențe.

(3) Comunicarea Comisiei intitulată „Un nou SEC pentru cercetare și inovare" ([3]), adoptată la 30 septembrie 2020, recunoaște faptul că în cursa mondială pentru talente sunt necesare condiții de dezvoltare a carierei pentru a atrage și a păstra cei mai buni cercetători din Uniune, precum și faptul că aspectele legate de locurile de muncă precare, în special cele destinate cercetătorilor aflați la începutul carierei, nu au fost abordate în mod adecvat în ultimii ani. În comunicare se subliniază, de asemenea, decalajul frecvent dintre competențele cercetătorilor și nevoile societății și ale economiei, precum și importanța pregătirii și stimulării cercetătorilor să urmeze o carieră în afara mediului academic, care să implice industria. În comunicarea respectivă se arată că, pentru a consolida carierele în cercetare în Europa, este nevoie de un set de instrumente constând în măsuri care vizează recunoașterea competențelor cercetătorilor, crearea unui cadru al competențelor cercetătorilor, sporirea mobilității și a mecanismelor de schimb dintre mediul academic și industrie, oportunități de formare specifică, precum și un portal de tip „ghișeu unic" pe care toți cercetătorii din sectorul public și cel privat să îl poată accesa pentru o gamă largă de servicii de sprijin. Comunicarea respectivă prevede, de asemenea, îmbunătățirea sistemului de evaluare a cercetării pentru a recunoaște în mod just și corespunzător diversitatea parcursurilor și activităților profesionale care răspund mai bine cerințelor societății.

([1]) Recomandarea 2005/251/CE a Comisiei din 11 martie 2005 privind Carta europeană a cercetătorilor și Codul de conduită pentru recrutarea cercetătorilor (JO L 75, 22.3.2005, p. 67).

([2]) Comunicare a Comisiei către Parlamentul European, Consiliu, Comitetul Economic și Social European și Comitetul Regiunilor intitulată „Agenda europeană pentru competențe în scopul promovării competitivității durabile, a echității sociale și a rezilienței", COM(2020) 274 final.

([3]) Comunicarea Comisiei către Parlamentul European, Consiliu, Comitetul Economic și Social European și Comitetul Regiunilor intitulată „Un nou SEC pentru cercetare și inovare", COM(2020) 628 final.

(4) Concluziile Consiliului privind noul Spațiu european de cercetare din 1 decembrie 2020 subliniază că asigurarea unor condiții de muncă atractive și sigure și sporirea atractivității carierelor în cercetare, ținând seama de știința deschisă, de egalitatea de gen, de competențele digitale, de evaluarea cercetării, de diversificarea carierelor în cercetare și de parcursurile profesionale axate pe cariere multiple, constituie elemente esențiale ale noului SEC, contribuind la atragerea și păstrarea cercetătorilor de excelență.

(5) În Concluziile Consiliului privind „Aprofundarea Spațiului european de cercetare: asigurarea unor cariere și condiții de muncă atractive și durabile pentru cercetători și transformarea circulației creierelor în realitate" din 28 mai 2021, s-a recunoscut faptul că cercetătorii se află în centrul sistemelor de cercetare și inovare ale Uniunii, precum și necesitatea unor acțiuni mai coordonate la nivelul Uniunii pentru a depăși provocările cu care se confruntă cercetătorii în prezent, pentru a construi cariere interoperabile și durabile în cercetare, care să permită parcursuri profesionale diversificate și axate pe cariere multiple, pentru a stimula circulația echilibrată a talentelor și pentru a transforma Uniunea într-o destinație atractivă pentru cercetători. Prin respectivele concluzii se propune efectuarea unei analize a posibilei evoluții a Cartei și Codului cercetătorilor către un cadru unic și cuprinzător, care abordează toate provocările conexe carierelor în cercetare dincolo de valori și principii și se axează pe toate domeniile posibile de ocupare a locurilor de muncă în domeniul cercetării și se solicită Comisiei să prezinte o propunere în 2022. Aspecte precum recrutarea, stimulentele pentru cercetătorii aflați la începutul carierei, diversificarea carierei și avansarea în carieră, interoperabilitatea cu toate sectoarele societății, inclusiv industria, evaluarea cercetătorilor, egalitatea de gen, echilibrul dintre viața profesională și cea privată, precum și îmbunătățirea guvernanței și a serviciilor EURAXESS și ale altor instrumente cum ar fi Europass, sunt propuse ca elemente care trebuie incluse în propunerea respectivă.

(6) Recomandarea (UE) 2021/2122 a Consiliului privind un pact pentru cercetare și inovare în Europa ([4]) se referă la carierele în cercetare și la mobilitatea cercetătorilor, precum și la evaluarea cercetării, a cercetătorilor și a instituțiilor, ca domenii de acțiune importante în contextul domeniilor prioritare de acțiune comună a Uniunii și a statelor membre în sprijinul SEC, indicând un set comun de valori și principii care să stea la baza cercetării și inovării în Uniune. Aceasta subliniază, de asemenea, necesitatea de a acorda o atenție sporită cercetătorilor ale căror cariere se află la început sau la un nivel intermediar, inclusiv obstacolelor specifice cu care se confruntă femeile aflate în aceste stadii ale carierei.

(7) Agenda de politici privind Spațiul european de cercetare (Agenda SEC) anexată la Concluziile Consiliului privind „Viitoarea guvernanță a Spațiului european de cercetare" din 26 noiembrie 2021 include acțiuni dedicate pentru „Realizarea de progrese în direcția reformei sistemului de evaluare pentru cercetare, cercetători și instituții în vederea îmbunătățirii calității, performanței și impactului acestora" și pentru „Promovarea unor cariere atractive și durabile în cercetare, a circulației echilibrate a talentelor, precum și a mobilității internaționale, transdisciplinare și intersectoriale în cadrul SEC". Cea din urmă acțiune menționată prevede dezvoltarea unui cadru al Uniunii pentru carierele în cercetare, precum și modernizarea instrumentelor și inițiativelor existente și crearea unor instrumente și inițiative noi. Aici se include: lansarea unui observator al carierelor în cercetare; o dezvoltare a Cartei și a Codului cercetătorilor; crearea platformei de talente a SEC ca punct de acces de tip ghișeu unic online pentru serviciile, rețeaua și portalurile EURAXESS, inclusiv HRS4R și RESAVER; lansarea inițiativei ERA4You pentru a promova circulația talentelor între sectoare și în întreaga Uniune; schimbul de bune practici în ceea ce privește sistemele de cercetare și inovare pentru a sprijini circulația echilibrată a creierelor și desfășurarea de proiecte-pilot cu alianțele universităților europene în legătură cu noul cadru pentru cariere în cercetare.

(8) Comunicarea Comisiei intitulată „O strategie europeană pentru universități", adoptată la 18 ianuarie 2022 ([5]), prevede crearea unui cadru pentru carierele în cercetare, în sinergie cu un cadru european pentru cariere atractive și durabile în învățământul superior, propunerea în acest sens trebuind să fie prezentată până în 2023.

(9) Comunicarea Comisiei intitulată „O nouă agendă europeană de inovare", adoptată la 5 iulie 2022 ([6]), recunoaște faptul că inovarea depinde de atragerea, cultivarea și păstrarea cu succes a persoanelor talentate, precum și de o gamă variată de competențe, și subliniază importanța mobilității intersectoriale.

([4]) Recomandarea (UE) 2021/2122 a Consiliului din 26 noiembrie 2021 privind un pact pentru cercetare și inovare în Europa (JO L 431, 2.12.2021, p. 1).

([5]) Comunicarea Comisiei către Parlamentul European, Consiliu, Comitetul Economic și Social European și Comitetul Regiunilor privind o strategie europeană pentru universități, COM(2022) 16 final.

([6]) Comunicarea Comisiei către Parlamentul European, Consiliu, Comitetul Economic și Social European și Comitetul Regiunilor – „O nouă agendă europeană de inovare", COM(2022) 332 final.

(10) Recomandarea (UE) 2022/2415 a Consiliului privind principiile directoare pentru valorificarea cunoștințelor ([7]) subliniază importanța investițiilor în dezvoltarea culturii, a practicilor, a competențelor și a capacităților antreprenoriale în rândul cercetătorilor și al altor actori din domeniul cercetării și inovării, inclusiv intermediarii, a căror dezvoltare profesională continuă este esențială, pentru a maximiza materializarea rezultatelor cercetării și inovării în soluții care aduc beneficii societății. Punerea în aplicare a recomandării respective va fi sprijinită printr-un Cod de bune practici privind colaborarea dintre industrie și mediul academic.

(11) Concluziile Consiliului referitoare la inițiativa privind universitățile europene – Crearea de legături între învățământul superior, cercetare, inovare și societate: pregătirea terenului pentru o nouă dimensiune a învățământului superior european ([8]) invită statele membre și Comisia să promoveze sinergii între dimensiunea învățământului superior a Spațiului european al educației (SEE), SEC și Spațiul european al învățământului superior (SEIS).

(12) Cercetătorii reprezintă o resursă fundamentală pentru societate. Aceștia efectuează activități de cercetare, promovează inovarea, contribuie la soluții pentru provocări societale și furnizează factorilor de decizie dovezi pentru procesele decizionale în cunoștință de cauză. Ei sunt talente cu înaltă calificare, care au un mare potențial de a satisface mai bine cererea de pe piața forței de muncă. Este esențială îmbunătățirea condițiilor de muncă în ansamblu și a mediului de lucru ale cercetătorilor, inclusiv prin oferirea de salarii atractive.

(13) Sporirea atractivității și a stabilității carierelor în cercetare în întreaga Uniune reprezintă un element esențial al SEC. Prin urmare, există o nevoie clară de a spori atractivitatea și caracterul incluziv ale carierelor în cercetare pentru studenți și absolvenți și de a institui condiții-cadru pentru păstrarea cercetătorilor talentați în Uniune, precum și de a transforma Uniunea într-o destinație atractivă și competitivă pentru cercetătorii internaționali.

(14) De peste 25 de ani, ca parte a programelor-cadru pentru cercetare și inovare, acțiunile Marie Skłodowska-Curie (MSCA) sprijină cercetătorii din întreaga lume, în toate etapele carierelor lor, punând accent pe formare, competențe și dezvoltarea carierei. Programul a avut, de asemenea, un efect de structurare asupra organizațiilor – instituții de învățământ superior, organizații de cercetare, întreprinderi etc. – prin diseminarea de bune practici și prin sporirea atractivității și vizibilității internaționale ale acestora, în special prin dezvoltarea unor programe de doctorat de excelență. MSCA contribuie la mobilitatea intersectorială, interdisciplinară și geografică, dezvoltă competențele cercetătorilor, abordează dezechilibrele de gen, păstrează cercetătorii talentați și atrage noi talente în Europa. În special, sistemul de doctorat industrial oferit de MSCA poate fi considerat un exemplu de bună practică, având în vedere că, în cadrul său, experiența în materie de cercetare, localizarea și supravegherea unui candidat la doctorat sunt partajate în mod egal între o instituție academică și una non-academică, cu dispoziții pentru asigurarea standardelor academice. Acesta constituie un exemplu important de interacțiune și cooperare între actorii din cadrul ecosistemului, promovând competențele transversale și mobilitatea intersectorială și sprijinind nevoile industriei de talente cu înaltă calificare și înțelegerea de către cercetători a provocărilor industriale, vizând mai multe oportunități de recrutare în cadrul ecosistemului.

(15) Datele deținute de Eurostat indică o tendință de creștere a numărului de cercetători în echivalent normă întreagă în Uniune. În 2021, în statele membre își desfășurau activitatea 2 milioane de cercetători, ceea ce reprezintă cu 627 000 mai mulți decât în 2011. Majoritatea cercetătorilor își desfășoară activitatea în sectorul întreprinderilor (56 %) și în sectorul învățământului superior (32 %), urmate de sectorul public (11 %). Este important să se susțină această creștere prin investiții, infrastructură și politici adecvate la nivel național și la nivelul Uniunii care să sprijine atractivitatea carierelor în cercetare, inclusiv în ceea ce privește diversitatea, incluziunea și egalitatea de gen și să se promoveze o cultură care să valorifice carierele în cercetare în toate sectoarele societății.

(16) Sunt necesare, de asemenea, o definiție și o înțelegere clară și comună a „cercetătorului” la nivelul Uniunii, de exemplu, definiția acceptată pe scară largă din Manualul Frascati,. Prin termenul de „cercetător” ar trebui să se înțeleagă un profesionist care desfășoară activități de cercetare și inovare în toate sectoarele, inclusiv în mediul academic (instituții de învățământ superior, organizații de cercetare, infrastructuri de cercetare), întreprinderi (inclusiv întreprinderi industriale, start-up-uri, întreprinderi de tip spin-off sau întreprinderi mici și mijlocii), organisme ale administrației publice (inclusiv organisme guvernamentale, organisme de elaborare a politicilor, laboratoare publice și sistemul de sănătate) și sectorul non-profit. Cercetătorii pot fi implicați, în plus, în diferite tipuri de activități în orice sector al economiei sau al societății. Sunt necesare eforturi în vederea obținerii unei recunoașteri depline a carierelor cercetătorilor, precum și în vederea îmbunătățirii comparabilității între statele membre și între sectoare.

([7]) Recomandarea (UE) 2022/2415 a Consiliului din 2 decembrie 2022 privind principiile directoare pentru valorificarea cunoștințelor (JO L 317, 9.12.2022, p. 141).

([8]) Concluziile Consiliului referitoare la inițiativa privind universitățile europene – Crearea de legături între învățământul superior, cercetare, inovare și societate: pregătirea terenului pentru o nouă dimensiune a învățământului superior european (JO C 221, 10.6.2021, p. 14).

(17) Cercetarea și inovarea de nivel înalt necesită sprijin din partea altor profesii. Printre acestea, merită să fie recunoscute în mod corespunzător carierele managerilor și ale tehnicienilor de cercetare, inclusiv prin intermediul unei analize suplimentare și al unei mai bune alinieri la nivelul Uniunii. Capacitatea de management al cercetării ar trebui să fie consolidată prin definirea aptitudinilor și a competențelor necesare, prin dezvoltarea programelor de formare relevante, prin promovarea comparabilității și prin posibilitatea ca titularii acestora să poată gestiona și sprijini în mod eficace cercetarea și inovarea.

(18) Clasificarea europeană a aptitudinilor, competențelor, calificărilor și ocupațiilor (ESCO) a fost actualizată în 2022 pentru a include taxonomii îmbunătățite ale competențelor și ocupațiilor pentru cercetători, indicând astfel ocupațiile relevante pentru cercetători în toate sectoarele pieței forței de muncă, precum și competențele transversale de care trebuie să dispună cercetătorii. Implementarea clasificării ESCO în EUROPASS și în Rețeaua de servicii europene pentru ocuparea forței de muncă (EURES) facilitează adoptarea respectivei taxonomii îmbunătățite pe piața forței de muncă. Pentru a asigura includerea categoriei specifice de „cercetător" în viitoarele revizuiri ale Clasificării internaționale standard a ocupațiilor (ISCO) pe care se bazează clasificarea ESCO, este necesară interacțiunea Comisiei cu Organizația Internațională a Muncii.

(19) Astfel cum se recunoaște în articolul 13 din Carta drepturilor fundamentale a Uniunii Europene și după cum se prevede în Declarația de la Bonn din 20 octombrie 2020 privind libertatea cercetării științifice, în Comunicatul de la Roma din 19 noiembrie 2020 privind Spațiul european al învățământului superior și în Recomandarea Consiliului (UE) 2021/2122, libertatea academică și libertatea cercetării științifice trebuie respectate ca o condiție esențială pentru ca cercetătorii să facă progrese în materie de cercetare și inovare. În ianuarie 2022, Comisia a publicat un document de lucru al serviciilor Comisiei privind combaterea ingerințelor străine în domeniul cercetării și inovării (C&I), care prezintă bunele practici pentru sprijinirea instituțiilor de învățământ superior și a organizațiilor de cercetare în procesul de protejare a valorilor lor fundamentale, inclusiv libertatea academică, integritatea și autonomia instituțională, precum și în procesul de protejare a personalului, a studenților, a rezultatelor cercetării și a activelor aferente cercetării.

(20) Este necesar să se abordeze în mod eficace inegalitățile de gen care persistă în carierele de cercetare – inclusiv diferența de remunerare între femei și bărbați, prejudecățile de gen în evaluare și recunoaștere, chestiunile legate de echilibrul dintre viața profesională și cea privată, precum și violența de gen – în plus față de posibilele intersectări ale aspectelor de gen cu alte condiții de vulnerabilitate sau marginalizare, cum ar fi etnia, handicapul și orientarea sexuală, întrucât toate acestea afectează accesul la carieră și avansarea în carieră. În acest sens pot fi importante o serie de instrumente vizând schimbările instituționale, cum ar fi planurile incluzive privind egalitatea de gen, ținându-se seama de strategia privind egalitatea de gen 2020-2025 ([9]). Conform „SHE FIGURES 2021" (Statistici despre femei 2021), femeile continuă să fie subreprezentate în rândul cercetătorilor, cu un procent de reprezentare de numai 33 % din numărul total al cercetătorilor din Uniune. De asemenea, respectivul raport a mai demonstrat și că în sectorul învățământului superior cercetătorii care sunt femei prezintă un procent de angajare mai ridicat comparativ cu cel al cercetătorilor care sunt bărbați, în timp ce procentul de angajare a acestora în sectorul public și în mediul de afaceri este mai scăzut. La nivelul întregii Uniuni, o proporție mai mare de cercetători care sunt femei, comparativ cu cercetătorii care sunt bărbați, își desfășoară activitatea cu fracțiune de normă în cadrul unor contracte precare în învățământul superior – 11 % în cazul femeilor și 7 % în cazul bărbaților – femeile ocupând numai 26 % din posturile academice de vârf, cele de profesor universitar sau posturi de cercetător de nivel echivalent. Prin urmare, sunt necesare eforturi specifice pentru a aborda problemele legate de inegalitățile de gen în carierele în cercetare și de subreprezentarea femeilor în științe, tehnologie, inginerie și matematică, în domeniul cercetării și inovării, precum și în sectorul învățământului superior, astfel cum se subliniază în Strategia europeană pentru universități.

(21) Pentru a sprijini dezvoltarea personală și profesională deplină a cercetătorilor din Uniune, în special a cercetătorilor aflați la începutul carierei, este esențial să se abordeze provocările existente care au consecințe negative asupra întregului sistem de cercetare și inovare din Uniune, dar și asupra pieței interne a cercetării. Printre astfel de provocări se numără aspecte legate de încadrarea în muncă și condițiile de muncă, cum ar fi statutul diferit, de la un stat membru la altul, de student sau de angajat conferit candidaților la doctorat, lipsa frecventă a unei recrutări deschise, transparente și bazate pe merite, precaritatea care decurge din contracte pe termen scurt bazate pe proiecte, accesul nesatisfăcător la șanse egale, lipsa oportunităților de mobilitate intersectorială în timpul formării doctorale și al muncii postdoctorale, lipsa unor măsuri legate de echilibrul dintre viața profesională și cea privată, de îngrijirea familială, de stare de bine în materie de sănătate fizică și mintală, precum și deficiențele instrumentelor de protecție socială, inclusiv dificultățile legate de transferabilitatea drepturilor între sectoare și state membre.

([9]) Comunicare a Comisiei către Parlamentul European, Consiliu, Comitetul Economic și Social European și Comitetul Regiunilor, „O Uniune a egalității: Strategia privind egalitatea de gen 2020-2025, COM(2020) 152 final.

(22) Capacitatea de inserție profesională și dezvoltarea carierei cercetătorilor aflați la începutul carierei ar putea fi sprijinite prin stimulente specifice pentru recrutarea acestora, cum ar fi stimulentele financiare și de protecție financiară, inclusiv prin oportunități pentru încheierea de contracte pe durată nedeterminată, în conformitate cu Directiva 1999/70/CE a Consiliului din 28 iunie 1999 ([10]). În acest sens, alături de finanțarea bazată pe proiecte, s-ar putea promova utilizarea mai largă a finanțării de referință sau a finanțării pentru ciclul de viață al cercetării. Finanțarea de referință oferă instituțiilor de învățământ superior sau organizațiilor de cercetare o proiecție a sprijinului financiar garantat în schimbul obținerii anumitor rezultate și al respectării anumitor standarde de calitate; finanțarea pentru ciclul de viață al cercetării este caracterizată printr-un concurs inițial de obținere a finanțării care se reînnoiește în cazul unei evaluări pozitive în urma unui proces de monitorizare. Acest lucru permite organizațiilor de cercetare să elaboreze strategii de cercetare pe termen mai lung și să își asume angajamente durabile față de angajați, utilizând în același timp finanțarea bazată pe proiecte pentru a continua explorarea de noi itinerarii.

(23) Astfel cum se afirmă la articolul 22 din Declarația universală a drepturilor omului, orice persoană, în calitatea sa de membru al societății, are dreptul la securitate socială și este îndreptățită să obțină realizarea drepturilor economice, sociale și culturale indispensabile pentru demnitatea sa și libera dezvoltare a personalității sale. Principiul 15 al Pilonului european al drepturilor sociale afirmă că, la pensie, atât salariații cât și persoanele care desfășoară activități independente au dreptul la o pensie proporțională cu cotizațiile plătite și care să le asigure un venit adecvat. Cu toate acestea, cercetătorii mobili întâmpină dificultăți în acumularea de pensii suplimentare adecvate ca urmare a perioadelor pentru satisfacerea condițiilor de intrare în drepturi, a comisioanelor de transfer ridicate, a cunoștințelor limitate în ceea ce privește produse financiare complexe și a sarcinii administrative la pensionare. Prin urmare, cercetătorilor ar trebui să li se ofere garanții bazate pe Recomandarea Consiliului din 8 noiembrie 2019 privind accesul la protecție socială pentru lucrători și pentru persoanele care desfășoară o activitate independentă ([11]).

(24) RESAVER, soluția europeană în materie de pensii sprijinită de Comisie, care se ocupă cu furnizarea de pensii ocupaționale pentru organizațiile care desfășoară activități de cercetare și care va fi una dintre componentele viitoarei platforme de talente a SEC, dispune de potențialul necesar pentru a aborda problemele în materie de protecție socială cu care se confruntă cercetătorii mobili. Cu toate acestea, cooptarea acesteia este împiedicată de nivelul limitat de conștientizare și de obstacolele semnificative de ordin administrativ și juridic. În scopul garantării dreptului la pensie ocupațională al cercetătorilor mobili, ar trebui să fie furnizate informații cu privire la modul în care dreptul la pensie ar putea fi afectat de potențiala mobilitate și ar trebui să fie avută în vedere participarea la RESAVER a organizațiilor care desfășoară activități de cercetare.

(25) Mobilitatea intersectorială, interdisciplinară și geografică echilibrată este esențială pentru sporirea eficacității, durabilității și atractivității carierelor în cercetare în Uniune. În baza acestei mobilități, întregul sistem de cercetare și inovare devine mai competitiv și promovează o mai bună producere, circulație și utilizare a cunoștințelor, încurajând și facilitând în același timp parcursuri profesionale neliniare și diversificate. Respectivele forme de mobilitate, inclusiv mobilitatea virtuală, ar trebui să fie promovate, sprijinite prin stimulente și integrate în mod corespunzător în procesul de dezvoltare profesională a cercetătorilor și ar trebui să fie luate măsuri pentru a aborda obstacolele existente în materie de mobilitate de orice natură, inclusiv transferabilitatea limitată a granturilor, sarcina administrativă, de exemplu pentru călătoriile în interes de serviciu sau pentru recunoașterea permiselor de ședere pentru cercetătorii mobili, provocările legate de relocare sau barierele lingvistice ori în ceea ce privește transferul drepturilor de pensie.

(26) Pentru a promova cariere interoperabile și intersectoriale în cercetare, este necesară o schimbare de abordare prin care sistemul de evaluare și de recompensare ar urma să atribuie o valoare egală carierelor urmate în toate sectoarele și nu ar penaliza mobilitatea geografică, interdisciplinară și intersectorială sau întreruperile în carieră sau relocarea carierei, inclusiv concediul sabatic sau concediul pentru creșterea copilului, iar cercetătorii ar lua în considerare cariere, în mod nediferențiat, atât în mediul academic, cât și în afara acestuia. Parcursurile profesionale axate pe cariere multiple, caracterizate prin mobilitate geografică, sectorială și interorganizațională, sau parcursurile profesionale hibride, caracterizate de existența unei combinații simultane de sectoare, merită să fie recunoscute pe deplin și luate în considerare pe picior de egalitate cu parcursurile profesionale liniare – care trebuie înțelese drept cariere care urmează o linie dreaptă de evoluție de la un post la altul, de obicei în cadrul aceluiași domeniu sau al aceleiași discipline.

([10]) Directiva 1999/70/CE a Consiliului din 28 iunie 1999 privind acordul-cadru cu privire la munca pe durată determinată, încheiat între CES, UNICE și CEEP (JO L 175, 10.7.1999, p. 43).

([11]) Recomandarea Consiliului din 8 noiembrie 2019 privind accesul la protecție socială pentru lucrători și pentru persoanele care desfășoară o activitate independentă (2019/C 387/01) (JO C 387, 15.11.2019, p. 1).

(27) În unele cazuri, formarea doctorală continuă să se axeze preponderent pe cariere viitoare în mediul academic și nu ia suficient în considerare gama mai largă de ocupații în sectoarele relevante, nici importanța promovării spiritului antreprenorial în rândul cercetătorilor. Înzestrarea cercetătorilor cu competențe transversale prin formare profesională formală și informală, alături de competențele solide în materie de cercetare, este extrem de importantă pentru crearea unor oportunități mai bune în materie de carieră, a mobilității intersectoriale și a inovării, precum și pentru sporirea atractivității carierelor în cercetare în Uniune.

(28) Cadrul european al competențelor pentru cercetători (ResearchComp) elaborat de Comisie în consultare cu statele membre și cu părțile interesate va juca un rol important în înzestrarea cercetătorilor cu o gamă largă de competențe transversale și va elimina decalajul în materie de competențe dintre mediul academic și toate celelalte sectoare relevante. Formarea cercetătorilor, inclusiv formarea doctorală, ar putea fi dezvoltată conform competențelor descrise în cadru și pe baza schimbului de bune practici, pentru a permite perfecționarea și recalificarea cercetătorilor pe tot parcursul vieții. Ar fi necesare mecanisme adecvate de recunoaștere și validare a oportunităților de formare profesională formală și informală, inclusiv a formării la locul de muncă.

(29) Pentru a se asigura că formarea cercetătorilor este stabilită sau elaborată în cooperare pe baza nevoilor reale în materie de competențe, ar putea fi promovată interacțiunea și cooperarea dintre mediul academic, industrie, mediul de afaceri, administrația publică, sectorul non-profit și toți ceilalți actori relevanți din cadrul ecosistemului, inclusiv, de exemplu, în ceea ce privește stagiile de practică sau observarea directă la locul de muncă. În acest sens, ar putea fi luate în considerare principiile pentru formarea doctorală inovatoare incluse în raportul adoptat în 2011 de Grupul de coordonare pentru resurse umane și mobilitate al SEC, precum și Recomandarea (UE) 2022/2415 a Consiliului din 2 decembrie 2022 privind principiile directoare pentru valorificarea cunoștințelor ([12]), care subliniază necesitatea de a avea un sistem care să conducă la activități antreprenoriale în beneficiul cercetătorilor.

(30) Promovarea unei mentalități antreprenoriale și a competențelor conexe în rândul cercetătorilor, inclusiv a competențelor pentru atragerea de investitori și de capital, este esențială pentru a îmbunătăți valorificarea cunoștințelor și transformarea ideilor inovatoare în servicii și produse noi cu un potențial mai mare de introducere pe piață, de creștere durabilă, de inovare și de beneficii societale. Pentru un parcurs antreprenorial de succes este necesar ca activele intelectuale, cum ar fi publicațiile, datele, know-how-ul și proprietatea intelectuală să fie înțelese în mod corespunzător și gestionate în mod eficient, astfel cum se prevede în Recomandarea (UE) 2022/2415 a Consiliului din 2 decembrie 2022 privind principiile directoare pentru valorificarea cunoștințelor ([12]).

(31) Circulația intersectorială a talentelor și îmbunătățirea interoperabilității locurilor de muncă din cercetare și inovare între sectoare necesită o combinație de măsuri diferite și complementare la nivel național și la nivelul Uniunii, în conformitate cu principiile libertății academice și autonomiei instituționale, inclusiv o reformă a sistemului. O abordare în materie de politică ce implică învățarea reciprocă pe baza unor modele de succes pentru programe de mobilitate intersectorială poate contribui la consolidarea unei cooperări reciproc avantajoase între mediul academic și mediul non-academic și întărirea ecosistemelor de inovare, îmbunătățirea formării și învățării pe tot parcursul vieții pentru cercetători, inovatori și alte talente din domeniul cercetării și inovării, inclusiv perfecționarea în scopul consolidării capacității de sprijin și consolidarea sistemului de recrutare și stimularea dezvoltării competențelor antreprenoriale în rândul cercetătorilor.

(32) Cercetătorii nu sunt întotdeauna conștienți de rolul esențial al elaborării politicilor în domeniul cercetării și inovării și de rolul științei în elaborarea politicilor. Ambele dimensiuni pot avea un impact asupra carierelor în cercetare în general, precum și asupra sistemului de cercetare și inovare. Este important ca formarea doctorală să includă și să inspire această conștientizare, pentru a asigura o mai mare implicare a cercetătorilor în procesul de elaborare a politicilor și pentru a recunoaște activitățile acestora în domeniul științei pentru elaborarea politicilor de-a lungul întregii lor cariere.

(33) Cercetătorii, în special cei aflați la începutul carierei, ar trebui să fie informați cu privire la oportunitățile existente în toate sectoarele și cu privire la posibilitatea de a da curs respectivelor oportunități pentru a-și lărgi spectrul de dezvoltare personală și profesională. Serviciilor de consiliere și sprijin pentru carieră adaptate nevoilor cercetătorilor le revine un rol important, stimulând mobilitatea intersectorială, interdisciplinară, geografică și virtuală, precum și posibilitatea de a întreprinde activități antreprenoriale. Ar trebui să fie promovată mobilitatea interinstituțională, în

([12]) Recomandarea (UE) 2022/2415 a Consiliului din 2 decembrie 2022 privind principiile directoare pentru valorificarea cunoștințelor (JO L 317, 9.12.2022, p. 141).

special între diferitele profiluri ale instituțiilor de învățământ superior și ale organizațiilor de cercetare, alături de parcursurile academice diverse și flexibile, inclusiv prin abordarea obstacolelor legate de diferențele dintre competențele dezvoltate în instituția anterioară și cele necesare în cadrul noii instituții.

(34) Evaluarea cercetării ar trebui să permită evaluarea performanței cercetătorilor și a activităților de cercetare, pentru a obține un nivel cât mai înalt de calitate și de impact. Astfel cum se subliniază în Apelul de la Paris din 2022 privind evaluarea cercetării, în raportul exploratoriu „Towards a reform of the research assessment system" (Către o reformă a sistemului de evaluare a cercetării) publicat de Comisie în 2021 și, pe baza unei ample consultări cu părțile interesate, în Concluziile Consiliului privind „Evaluarea cercetării și punerea în aplicare a științei deschise" din 10 iunie 2022, precum și în Acordul privind reformarea evaluării cercetării publicat în iulie 2022, o evaluare adecvată a performanței presupune recunoașterea rezultatelor, activităților și practicilor din ce în ce mai diverse ale cercetării, inclusiv colaborarea și partajarea în mod deschis a rezultatelor, precum și asigurarea unor standarde înalte în materie de integritate a cercetării și a unui impact societal al cercetării. Prin urmare, pentru evaluarea cercetătorilor ar trebui să se facă trecerea către o abordare mai echilibrată între evaluarea cantitativă și cea calitativă a cercetării, acordând întâietate evaluării calitative de tip *inter pares*, susținută de utilizarea responsabilă a indicatorilor cantitativi.

(35) Pentru a consolida carierele în mediul academic, până la cele mai înalte funcții, este necesar un sistem de acces la carieră și de avansare în carieră transparent, structurat, favorabil incluziunii și bazat pe egalitatea de gen. În acest scop, la nivelul statelor membre și al organizațiilor care desfășoară activități de cercetare, ar putea fi avută în vedere dezvoltarea unor sisteme de titularizare, care trebuie înțelese drept cadre definite în care un contract pe durată determinată prezintă perspectiva avansării pe un post permanent, sub rezerva unei evaluări pozitive.

(36) În pofida eforturilor depuse la nivelul Uniunii, la nivel național și la nivel regional, problema exodului talentelor dinspre regiunile mai puțin dezvoltate din Uniune persistă, astfel cum se subliniază în Comunicarea Comisiei intitulată „Valorificarea talentelor în regiunile Europei" ([13]), fiind necesare măsuri suplimentare pentru a realiza o mobilitate geografică mai echilibrată în rândul cercetătorilor. Analizele Comisiei privind circulația talentelor desfășurate în perioada 2021-2022 arată contribuția pozitivă a acțiunilor existente la nivelul Uniunii în sensul încurajării circulației mai echilibrate a creierelor, însă identifică, de asemenea, provocări persistente și furnizează modalități de atragere a creierelor. Mediile de cercetare de excelență – inclusiv infrastructurile de cercetare –, condițiile de muncă atractive și un nivel al remunerației pe măsura calificărilor profesionale și a activităților desfășurate joacă un rol foarte important în acest context, însă necesită adesea reforme ale sistemelor naționale de cercetare și inovare. Ar trebui să fie aplicată o abordare în materie de politici de natură a sprijini și stimula astfel de transformări ale sistemului, care să cuprindă exerciții de învățare reciprocă pe baza unor parcursuri profesionale de succes care au permis o circulație mai echilibrată a talentelor în statele membre.

(37) Obiectivul principal al EURAXESS, o inițiativă paneuropeană unică care furnizează informații și servicii de sprijin gratuit cercetătorilor și familiilor acestora, este de a sprijini mobilitatea și dezvoltarea carierei cercetătorilor, asigurând în același timp o rezervă durabilă de talente în domeniul cercetării și inovării și consolidând colaborarea științifică dintre Uniune și întreaga lume. Pentru a acorda sprijin suplimentar în vederea îndeplinirii acestui obiectiv, EURAXESS ar putea să extindă sfera de cuprindere a activităților sale de furnizare de informații și de sprijin pentru cercetători, instituții de învățământ superior și organizații de cercetare, în baza unei structuri optimizate de servicii și de guvernanță, cu o experiență digitală și de utilizare îmbunătățită și în condițiile asigurării interoperabilității cu alte inițiative ale Uniunii, cum ar fi Europass și EURES. Eficacitatea și coerența portalurilor de informare și serviciilor EURAXESS ar beneficia de pe urma unor organizații naționale de primă linie puternice.

(38) Pentru a rămâne competitivă la nivel mondial, Uniunea trebuie să devină mai atractivă pentru talentele din întreaga lume, evitând totodată exodul de talente care afectează țările în curs de dezvoltare. Comunicarea Comisiei intitulată „Atragerea de competențe și de talente în UE", adoptată la 27 aprilie 2022 ([14]), subliniază necesitatea ca Uniunea să devină mai atractivă pentru talentele de la nivel mondial, în special prin promovarea inovării și a antreprenoriatului în Uniune și prin explorarea de noi posibilități de migrație legală în Uniune pe termen mediu și mai lung. Revizuirea Directivei (UE) 2021/1883 a Parlamentului European și a Consiliului ([15]) a reprezentat un pas important pentru sporirea atractivității Uniunii, permițând migranților cu înaltă calificare să beneficieze de drepturi îmbunătățite,

([13]) Comunicarea Comisiei către Parlamentul European, Consiliu, Comitetul Economic și Social European și Comitetul Regiunilor din 17 ianuarie 2023 „Valorificarea talentelor în regiunile Europei", COM(2023) 32 final.

([14]) Comunicarea Comisiei către Parlamentul European, Consiliu, Comitetul Economic și Social European și Comitetul Regiunilor intitulată „Atragerea de competențe și de talente în UE", COM/2022/657 final.

([15]) Directiva (UE) 2021/1883 a Parlamentului European și a Consiliului din 20 octombrie 2021 privind condițiile de intrare și de ședere a resortisanților țărilor terțe pentru ocuparea unor locuri de muncă înalt calificate și de abrogare a Directivei 2009/50/CE a Consiliului (JO L 382, 28.10.2021, p. 1).

precum și de proceduri mai rapide și simplificate. Directiva (UE) 2016/801 a Parlamentului European și a Consiliului contribuie ([16]), de asemenea, la îndeplinirea respectivelor obiective, prin facilitarea și sporirea atractivității venirii în Uniune a studenților și a cercetătorilor, promovând totodată circulația cunoștințelor și a competențelor prin intermediul unor drepturi îmbunătățite de mobilitate în interiorul Uniunii.

(39) Carta și Codul cercetătorilor sunt revizuite pentru a răspunde noilor realități și provocărilor cu care se confruntă în prezent cercetătorii și instituțiile, inclusiv pentru o mai bună integrare, pe de o parte, a echilibrului de gen, a egalității de gen și a incluziunii, cuprinzând măsuri care vizează medii de cercetare fără violență de gen, precum și, pe de altă parte, a practicilor științei deschise. Noua Cartă a cercetătorilor, care figurează în anexa II la prezenta recomandare, este simplificată pentru a facilita punerea sa în aplicare și pentru a promova adoptarea sa dincolo de sectorul academic. Toate organizațiile care angajează cercetători sau le oferă finanțare sunt invitate să aprobe noua Cartă a cercetătorilor. Se consideră că organizațiile care au aprobat principiile versiunii actuale a Cartei și a Codului cercetătorilor aprobă și noua Cartă a cercetătorilor. Acest lucru ar trebui să fie valabil în special în cazul instituțiilor care au intrat în procesul HRS4R sau au finalizat acest proces, a cărui primă etapă presupune aprobarea Cartei cercetătorilor.

(40) Este necesar un observator al carierelor în cercetare, care să aducă laolaltă, într-un singur loc, cele mai bune date curente ale Uniunii, pentru a monitoriza punerea în aplicare a măsurilor de consolidare a carierelor în cercetare și a reformării sistemului. Acesta ar trebui să răspundă cerințelor de date ale statelor membre și ale organizațiilor care desfășoară activități de cercetare relevante pentru adaptarea și elaborarea de politici în materie de cariere în cercetare. În egală măsură, acesta ar trebui să sprijine cercetătorii să înțeleagă mai bine provocările și oportunitățile și să promoveze atractivitatea organizațiilor europene care desfășoară activități de cercetare pentru cele mai bune talente. În cazul în care acest lucru este relevant, ar putea fi luate în considerare legăturile cu Observatorul european al sectorului învățământului superior propus în Strategia europeană pentru universități. Datele colectate pentru aplicarea Regulamentului (UE) 2019/1700 al Parlamentului European și al Consiliului ([17]) ar putea fi adaptate pentru a răspunde nevoilor utilizatorilor Observatorului carierelor în cercetare.

(41) Pentru ca acest cadru european pentru atragerea și păstrarea în Uniune a talentelor din domeniul cercetării, inovării și antreprenoriatului să aibă succes, sunt necesare angajamente din partea statelor membre și a tuturor părților interesate implicate. În special, s-ar putea încuraja participarea pe bază de voluntariat, în baza unei abordări ascendente, a alianțelor între instituții de învățământ superior, cum ar fi cele instituite în cadrul Inițiativei privind universitățile europene și sprijinite prin Programul Erasmus+ și prin programele-cadru pentru cercetare și inovare, precum și cele din sectorul mai larg al învățământului superior, organizațiile de cercetare și toate părțile interesate relevante, pentru a contribui la punerea în aplicare pe scară largă a cadrului prin desfășurarea de proiecte-pilot cuprinzând activitățile relevante.

(42) Respectivele recomandări ar trebui să fie puse în aplicare ținând seama în mod corespunzător de marea diversitate a sistemelor și circumstanțelor naționale în materie de cercetare și inovare și de principiul autonomiei instituționale a instituțiilor de învățământ superior și a organizațiilor de cercetare din întreaga Uniune,

ADOPTĂ PREZENTA RECOMANDARE:

Cercetători, manageri în domeniul cercetării și tehnicieni de cercetare în Spațiul european de cercetare

1. În sensul prezentei recomandări:

„Cercetători” înseamnă profesioniști implicați în conceperea sau crearea de noi cunoștințe științifice bazate pe concepte sau ipoteze originale. Ei desfășoară activități de cercetare și îmbunătățesc sau dezvoltă concepte, teorii, modele, infrastructuri, tehnici, instrumente, software sau metode operaționale. Cercetătorii pot fi implicați integral sau parțial în diferite tipuri de activități, cum ar fi cercetare fundamentală sau aplicată, dezvoltare experimentală, echipamente de

([16]) Directiva (UE) 2016/801 a Parlamentului European și a Consiliului din 11 mai 2016 privind condițiile de intrare și de ședere a resortisanților țărilor terțe pentru cercetare, studii, formare profesională, servicii de voluntariat, programe de schimb de elevi sau proiecte educaționale și muncă au pair (JO L 132, 21.5.2016, p. 21).

([17]) Regulamentul (UE) 2019/1700 al Parlamentului European și al Consiliului din 10 octombrie 2019 de stabilire a unui cadru comun pentru statisticile europene referitoare la persoane și gospodării, bazate pe datele la nivel individual colectate din eșantioane, de modificare a Regulamentelor (CE) nr. 808/2004, (CE) nr. 452/2008 și (CE) nr. 1338/2008 ale Parlamentului European și ale Consiliului și de abrogare a Regulamentului (CE) nr. 1177/2003 al Parlamentului European și al Consiliului și a Regulamentului (CE) nr. 577/98 al Consiliului (JO L 261 I, 14.10.2019, p. 1).

cercetare operațională în orice sector al economiei sau al societății și diseminarea și valorificarea rezultatelor cercetării. De asemenea, aceștia pot fi implicați parțial, printre altele, în gestionarea proiectelor, activitatea didactică, mentorat, sprijinirea elaborării de politici bazate pe date concrete, practici ale științei deschise, activități de transfer de cunoștințe și tehnologie și comunicarea științifică. Cercetătorii identifică opțiuni pentru noi activități de cercetare și dezvoltare, pe care le planifică și le gestionează utilizând competențe și cunoștințe de nivel înalt dobândite prin educație și formare formală sau prin experiență.

2. Cercetătorii își pot desfășura activitățile cu aceeași relevanță în toate sectoarele în care se desfășoară activități de cercetare și inovare, inclusiv în mediul academic, industrie, mediul de afaceri, administrația publică, precum și în sectorul non-profit, atunci când competențele, cunoștințele și atitudinile lor pot aduce beneficii societății europene, sistemului de cercetare și inovare și economiei.

3. Cercetătorii și alți profesioniști pot întreprinde cariere în domeniul managementului cercetării în vederea gestionării și sprijinirii activităților de cercetare și inovare. Carierele în domeniul managementului cercetării ar trebui să fie încadrate și recunoscute în mod adecvat la nivelul Uniunii, prin definirea aptitudinilor și competențelor relevante, pentru a consolida capacitatea profesională a managerilor din domeniul cercetării, pentru a permite dezvoltarea de programe de formare relevante și pentru a promova comparabilitatea. Managerii în domeniul cercetării pot îndeplini diferite sarcini, de exemplu:

   (a) simplificarea sau facilitarea planificării, dezvoltării, gestionării, gestionării datelor FAIR, administrării, monitorizării, comunicării și valorificării activităților de cercetare și inovare;

   (b) asigurarea respectării obiectivelor de politică, a cerințelor programului de finanțare, a normelor financiare și a reglementărilor legale;

   (c) îmbunătățirea eficienței și eficacității proiectelor sau sistemelor de cercetare și inovare;

   (d) sporirea impactului cercetării și inovării asupra politicilor și a societății;

   (e) sprijinirea elaborării și punerii în aplicare a politicilor, programelor și proiectelor în domeniul cercetării și inovării.

4. Tehnicienii de cercetare sunt profesioniști ale căror sarcini principale necesită un nivel ridicat de cunoștințe tehnice, formare și experiență în unul sau mai multe domenii ale ingineriei, științelor fizice și științelor vieții sau științelor sociale și umaniste. Aceștia participă la îndeplinirea unor sarcini științifice și tehnice care implică aplicarea de concepte și metode operaționale și utilizarea de echipamente de cercetare, de obicei sub supravegherea cercetătorilor. Tehnicienii de cercetare au un rol esențial de sprijin în desfășurarea activităților de cercetare și inovare la nivel înalt. Statele membre ar trebui să ia în considerare încadrarea și recunoașterea adecvată a carierelor tehnicienilor de cercetare la nivel național.

5. Toți cercetătorii, indiferent de statutul lor și de sectorul în care sunt angajați, ar trebui să fie încadrați în următoarele profiluri:

   (a) R1 – cercetător debutant: cercetători care desfășoară activități de cercetare sub supraveghere până când obțin doctoratul sau un nivel de competență și experiență echivalent.

   (b) R2 – cercetător recunoscut: cercetători cu doctorat sau un nivel de competență și experiență echivalent, care nu au atins încă un nivel semnificativ de independență în dezvoltarea propriei cercetări, atragerea de finanțare sau conducerea unui grup de cercetare.

   (c) R3 – cercetător consacrat: cercetători cu doctorat sau un nivel de competență și experiență echivalent, care sunt capabili să își dezvolte în mod independent propria cercetare, să atragă finanțare și să conducă un grup de cercetare.

   (d) R4 – cercetător principal: cercetători cu doctorat sau un nivel de competență și experiență echivalent, care sunt recunoscuți ca lideri ai domeniului lor de cercetare de către omologi.

6. În sensul prezentei recomandări, profilurile R1 și R2 ar trebui să fie considerate profiluri aferente cercetătorilor aflați la începutul carierei, iar profilurile R3 și R4 ar trebui să fie considerate profiluri aferente cercetătorilor cu calificări superioare.

   Statelor membre li se recomandă să încurajeze utilizarea trimiterilor la profiluri în cazul tuturor posturilor vacante destinate în mod specific cercetătorilor sau, după caz, să invite instituțiile de învățământ superior și organizațiile de cercetare să facă acest lucru.

   Profilurile nu ar trebui să fie considerate neapărat etape ale unui parcurs profesional progresiv.

În anexa I este prevăzută o listă neexhaustivă de exemple de ocupații pentru cercetătorii din toate sectoarele în cadrul profilurilor R1-R4.

Recunoașterea, interoperabilitatea și comparabilitatea carierelor cercetătorilor

7. Statelor membre și Comisiei li se recomandă să promoveze și să sprijine o recunoaștere deplină a carierelor cercetătorilor, precum și respectul egal și recompensarea egală cu privire la diferitele parcursuri profesionale, indiferent de sectorul în care aceștia sunt angajați sau își desfășoară activitatea, și să ia măsuri de sprijin care să permită interoperabilitatea și comparabilitatea lor deplină între statele membre, sectoare și instituții.

8. Parcursurile profesionale neliniare, axate pe cariere multiple și hibride ar putea fi încurajate și sprijinite de statele membre și ar trebui să fie luate în considerare pe picior de egalitate cu parcursurile profesionale liniare cu rezultate profesionale multiple.

9. Statelor membre li se recomandă să pună în aplicare noi versiuni și actualizări ale clasificării europene a aptitudinilor, competențelor, calificărilor și ocupațiilor, în special în ceea ce privește ocupațiile și competențele cercetătorilor.

10. Statelor membre li se recomandă să încurajeze existența de birouri de resurse umane în toate sectoarele, pentru a cartografia structurile profesionale pentru cercetători în funcție de profilurile menționate la punctul 5 din prezenta recomandare.

Încadrarea în muncă și condițiile de muncă

11. Statelor membre li se recomandă să promoveze și să susțină selecția și recrutarea deschisă, transparentă și bazată pe merite a candidaților, fără a penaliza întreruperile în carieră sau parcursurile profesionale neliniare, axate pe cariere multiple și hibride.

12. Statelor membre li se recomandă să încurajeze respectarea contractelor colective de muncă și a unui dialog social eficace și să ia măsuri de sprijin, astfel încât angajatorii și finanțatorii să ofere condiții de cercetare și de muncă atractive, incluzive și competitive în baza cărora cercetătorii să fie apreciați, încurajați și sprijiniți. Măsurile de sprijin respective ar putea include:

   (a) asigurarea unei remunerații corespunzătoare, a echilibrului dintre viața profesională și cea privată și a unor condiții de muncă flexibile care contribuie la o apropiere între viața personală, familie, îngrijire, sănătate, siguranță și stare de bine generală, care să nu aducă atingere carierelor;

   (b) asigurarea egalității de gen, a echilibrului de gen, a egalității de șanse și a incluziunii pentru cercetătorii din toate mediile, inclusiv pentru grupurile subreprezentate și marginalizate, precum și promovarea, în rândul organizațiilor care desfășoară activități de cercetare și al organizațiilor de finanțare, a utilizării, punerii în aplicare și monitorizării instrumentelor de schimbare instituțională, cum ar fi planurile privind egalitatea de gen incluzive, deschise către intersectări între categorii de gen și alte categorii sociale, în conformitate cu noul cadru al Spațiului european de cercetare și cu Strategia europeană pentru universități;

   (c) protejarea libertății cercetării științifice împotriva oricăror limitări sau ingerințe posibile, inclusiv din partea actorilor externi;

   (d) oferirea de sprijin specific la nivel instituțional cercetătorilor în ceea ce privește îndeplinirea atribuțiilor de natură administrativă;

   (e) întreprinderea de acțiuni ferme pentru combaterea fenomenului precarității și pentru sprijinirea securității și stabilității locurilor de muncă. În acest mod s-ar putea stimula, pe bază voluntară, stabilirea unui prag maxim pentru numărul de contracte pe durată determinată pentru fiecare organizație în parte din totalul resurselor umane reprezentate de cercetători. Ori de câte ori sunt îndeplinite sarcini de cercetare permanente, pe termen lung sau cu recurență ridicată, sunt recomandate ca instrument adecvat contractele de muncă pe durată nedeterminată. Cercetătorii cu contracte pe durată determinată ar trebui să beneficieze de măsuri specifice – astfel cum se menționează la punctul 29 din prezenta recomandare – care să promoveze dezvoltarea și continuitatea carierei lor;

   (f) luarea în considerare a utilizării unor diverse modele de finanțare – de exemplu, finanțarea de referință, pentru ciclul de viață sau cea bazată pe proiecte – pentru a permite organizațiilor de cercetare să elaboreze strategii de cercetare pe termen mai lung și să își asume angajamente mai durabile față de angajați;

(g) asigurarea accesului la o protecție socială adecvată, indiferent de forma raporturilor de muncă, fără a aduce atingere dreptului statelor membre de a defini principiile fundamentale ale sistemelor lor de securitate socială. Astfel de măsuri ar putea să se refere la următoarele ramuri, în măsura în care ele sunt prevăzute de statele membre:

1. prestații de șomaj;

2. prestații de boală și de asistență medicală;

3. concediu de maternitate, concediu de paternitate, concediu pentru creșterea copilului și prestații conexe;

4. prestații de invaliditate;

5. prestații pentru limită de vârstă și prestații de urmaș;

6. prestații în cazul unor accidente de muncă și boli profesionale.

13. Statelor membre li se recomandă să asigure accesul cercetătorilor la informații actualizate, cuprinzătoare, ușor de utilizat și de înțeles cu privire la drepturile și obligațiile care le revin în materie de protecție socială, precum și să se asigure că drepturile, indiferent dacă sunt dobândite prin sisteme obligatorii sau voluntare, sunt păstrate, acumulate și/sau transferabile în toate tipurile de statute de ocupare a forței de muncă și de activități independente, în afara granițelor și între sectoare economice diferite, pe tot parcursul vieții profesionale a unei persoane sau pe parcursul unei anumite perioade de referință, precum și între diferite sisteme ale unei anumite ramuri de protecție socială.

14. Statelor membre care urmăresc să sporească economisirea prin cotizații definite în regimuri suplimentare li se recomandă să promoveze utilizarea soluțiilor oferite de fondul de pensii RESAVER, care garantează absența unei perioade pentru satisfacerea condițiilor de intrare în drepturi și a comisioanelor pentru transferul de active.

15. Statelor membre li se recomandă să încurajeze măsuri specifice în sprijinul cercetătorilor aflați la începutul carierei, corespunzătoare profilurilor R1 și R2 menționate la punctul 5 din prezenta recomandare. Ținând seama de circumstanțele naționale, printre astfel de măsuri s-ar putea număra:

(a) asigurarea pentru cercetătorii debutanți a protecției sociale și a condițiilor de muncă aplicabile cercetătorilor aflați în alte etape ale carierei, precum și a unui venit adecvat;

(b) asigurarea pentru cercetătorii aflați la începutul carierei a unor stimulente financiare și de protecție socială;

(c) promovarea și sprijinirea utilizării de stimulente pentru recrutarea cercetătorilor aflați la începutul carierei de către angajatorii din toate sectoarele, în special prin intermediul contractelor de muncă pe durată nedeterminată;

(d) promovarea și recunoașterea mobilității interinstituționale, intersectoriale, interdisciplinare și geografice, inclusiv a mobilității virtuale;

(e) promovarea cooperării între mediul academic, finanțatorii cercetării și alți actori relevanți din cadrul ecosistemului, în special industria și alte întreprinderi, precum și organizațiile publice și non-profit, cu privire la competențele necesare și competențele furnizate, astfel încât să se încurajeze recrutarea de cercetători cu înaltă calificare care să corespundă competențelor specifice necesare în sectoarele în cauză;

(f) promovarea implicării cercetătorilor aflați la începutul carierei în echipe de cercetare, evitând impunerea unor sarcini care nu au legătură cu formarea științifică a acestora.

Cercetători calificați pentru cariere intersectoriale și interdisciplinare și pentru antreprenoriat și inovare

16. Obiectivul cercetătorului debutant este de a cultiva mentalitatea de cercetare, de a stimula flexibilitatea gândirii, creativitatea și autonomia intelectuală prin intermediul unui proiect de cercetare original și concret. Statelor membre li se recomandă să ia măsurile adecvate pentru a încuraja orientarea formării doctorale către respectivele obiective și, în plus, compatibilitatea acesteia cu carierele interoperabile în toate sectoarele relevante și cu practica științei deschise, inclusiv prin utilizarea ResearchComp, a principiilor formării doctorale inovatoare, a Codului de conduită european pentru integritatea în cercetare și a oricăror alte inițiative viitoare întreprinse cu scopul de a consolida competențele transversale ale cercetătorilor.

17. Comisiei i se recomandă să ia măsuri pentru a sprijini și a facilita utilizarea ResearchComp, pentru a promova schimbul de bune practici și pentru a analiza necesitatea unor revizuiri viitoare ale cadrului de competențe, acolo unde este necesar, în funcție de evoluția sistemului de cercetare și inovare și a pieței forței de muncă.

18. Statelor membre li se recomandă să pună accentul pe sisteme care urmăresc consolidarea competențelor transversale de care au nevoie cercetătorii pentru a se implica în activități de valorificare a cunoștințelor și în antreprenoriat. Aceste sisteme ar putea să includă activități de sensibilizare și cursuri de formare pe teme relevante, inclusiv gestionarea activelor intelectuale, standardizarea, colaborarea dintre industrie și mediul academic și dintre mediul academic și administrația publică, inclusiv activități de tipul „știința în sprijinul politicilor", precum și implicarea față de societate.

19. Statelor membre și Comisiei li se recomandă să încurajeze interacțiunea și cooperarea, inclusiv parteneriatele, între mediul academic, industrie, alte întreprinderi, administrația publică, sectorul non-profit și toți ceilalți actori relevanți din cadrul ecosistemului și să se asigure că formarea doctorală și formarea specifică sunt stabilite sau elaborate în cooperare, pe baza nevoilor reale în materie de competențe ale părților vizate, inclusiv prin valorificarea exemplelor de bune practici puse în aplicare în cadrul programelor existente la nivelul Uniunii și al statelor membre.

    Se recomandă ca o astfel de interacțiune și de cooperare să fie susținute în special în domeniile în care sunt necesare competențe specifice pentru utilizarea de infrastructuri de ultimă generație în materie de cercetare și tehnologie.

20. Statelor membre și Comisiei li se recomandă să ia măsuri pentru promovarea unei mentalități inovatoare și antreprenoriale în rândul cercetătorilor, inclusiv a competențelor necesare pentru atragerea de investiții, cu scopul de a le permite celor care urmează un parcurs profesional antreprenorial să își coreleze capacitățile în materie de producere a cunoștințelor cu competențele în materie de valorificare a cunoștințelor, astfel încât să transforme ideile inovatoare în afaceri și să stimuleze inovarea și progresul.

    Ar trebui să se pună un accent deosebit pe promovarea spiritului antreprenorial și a inovării în rândul femeilor, precum și pe înființarea de întreprinderi de tip spin-off conduse de femei. Aceeași abordare ar trebui să fie avută în vedere și pentru grupurile minoritare și cele marginalizate.

    Statele membre ar putea să aibă în vedere măsuri de atenuare a riscurilor potențiale pentru cercetătorii care urmează o carieră antreprenorială, inclusiv prin posibilitatea acestora de a reveni la parcursul profesional anterior.

21. Statelor membre li se recomandă să ia măsuri pentru a sprijini elaborarea și furnizarea de cursuri de formare specifică, să încurajeze oportunități de perfecționare și recalificare pentru cercetători pe modelul învățării pe tot parcursul vieții și să promoveze mobilitatea intersectorială și interdisciplinară. Statelor membre li se recomandă, de asemenea, să ia măsurile necesare pentru a promova o procedură de validare echitabilă și transparentă, în ceea ce privește oportunitățile de formare formală și informală, inclusiv formarea la locul de muncă.

22. Comisiei i se recomandă să întreprindă următoarele acțiuni în contextul dezvoltării de inițiative care să promoveze circulația intersectorială a talentelor:

    (a) sprijinirea învățării reciproce în rândul statelor membre pe baza modelelor de programe de mobilitate intersectorială stabilite de Comisie, în trei domenii prioritare:

        1. consolidarea cooperării dintre mediul academic și mediul non-academic;

        2. îmbunătățirea formării și a învățării pe tot parcursul vieții pentru cercetători, inovatori și alte talente din domeniul cercetării și inovării;

        3. stimularea spiritului antreprenorial, a competențelor transversale și a implicării în rândul cercetătorilor în activități care sporesc impactul social;

    (b) consolidarea componentelor mobilității intersectoriale din cadrul instrumentelor existente pentru mobilitatea cercetătorilor și completarea acestora cu noi instrumente, acolo unde se consideră necesar;

    (c) sensibilizarea cu privire la programele de mobilitate intersectorială, prin intermediul unei ramuri a platformei de talente a SEC menționată la punctul 33 din prezenta recomandare.

23. Statelor membre li se recomandă să ia în considerare instituirea unor sisteme naționale de promovare a mobilității intersectoriale în unul sau mai multe dintre cele trei domenii prioritare menționate la punctul 22 din prezenta recomandare.

24. Statelor membre li se recomandă să depună toate eforturile necesare pentru a promova eliminarea barierelor structurale și administrative existente care pot împiedica sau bloca mobilitatea între sectoare, inclusiv prin sprijinirea cercetătorilor în depășirea barierelor familiale și personale din calea mobilității, prin sprijinirea interoperabilității carierelor, după caz, și prin facilitarea mobilității temporare sau permanente, fără a împiedica parcursurile profesionale liniare în domeniul cercetării.

25. Statelor membre și Comisiei li se recomandă să promoveze mobilitatea interdisciplinară a cercetătorilor, inclusiv prin luarea în considerare și abordarea în mod adecvat a obstacolelor, cum ar fi lipsa recunoașterii și dificultățile în asigurarea finanțării din surse tradiționale.

Evaluarea și dezvoltarea carierei și avansarea în carieră

26. Statelor membre li se recomandă să sprijine recunoașterea importanței mobilității geografice, intersectoriale, interinstituționale, interdisciplinare și transdisciplinare ca mijloc important de îmbunătățire a cunoștințelor științifice și de dezvoltare profesională în orice etapă a carierei unui cercetător. Mobilitatea virtuală s-a dovedit a fi o resursă valabilă și poate fi, de asemenea, luată în considerare. Sistemul de evaluare și recompensare nu ar trebui să penalizeze parcursurile profesionale neliniare, axate pe cariere multiple și hibride.

27. Statelor membre și Comisiei li se recomandă să promoveze și să sprijine sisteme de evaluare și recompensare a cercetătorilor care:

(a) se bazează pe o analiză calitativă obiectivă, realizată de către omologi și alți experți relevanți, susținută de utilizarea responsabilă a indicatorilor cantitativi;

(b) recompensează calitatea și diferitele efecte potențiale ale cercetării lor asupra societății, a științei și a inovării;

(c) recunosc o diversitate de rezultate, printre altele, publicații, seturi de date, software, metodologii, protocoale, brevete; o diversitate de activități, printre altele, mentorat, supravegherea cercetării, roluri de conducere, antreprenoriat, gestionarea datelor FAIR – urmând principiile „ușor de găsit, accesibile, interoperabile și reutilizabile” –, evaluări *inter pares*, activitatea didactică, valorificarea cunoștințelor, cooperarea dintre industrie și mediul academic, sprijinirea elaborării de politici bazate pe date concrete, interacțiunea cu societatea; și o diversitate de practici, printre altele, știința deschisă, schimbul timpuriu de cunoștințe și de date, precum și colaborarea deschisă, pe lângă toate experiențele în materie de mobilitate menționate la punctul 26 din prezenta recomandare;

(d) asigură respectarea de standarde ridicate de etică și integritate în activitatea profesională a cercetătorilor, practică desfășurarea adecvată a activității de cercetare și apreciază bunele practici, inclusiv practicile deschise de partajare a rezultatelor cercetării și a metodologiilor de cercetare, ori de câte ori este posibil;

(e) utilizează criterii și procese de evaluare care respectă varietatea disciplinelor de cercetare și a contextelor naționale;

(f) sprijină diversitatea profilurilor de cercetător și a parcursurilor profesionale și apreciază contribuțiile individuale, dar și rolul echipelor, al activităților de colaborare și al interdisciplinarității;

(g) asigură egalitatea de gen, echilibrul de gen, egalitatea de șanse și incluziunea.

Pentru a asigura coerență în punerea în aplicare a recomandărilor enumerate la prezentul punct, statele membre sunt încurajate să susțină formarea continuă a actorilor implicați în procesul de evaluare și de recompensare.

28. Statele membre sunt invitate să încurajeze organizațiile să se alăture coaliților, alianțelor sau inițiativelor instituite cu scopul de a dezvolta sistemele de evaluare în conformitate cu recomandările enumerate la punctul 27 din prezenta recomandare. Statele membre sunt încurajate, de asemenea, să contracareze, în limitele competențelor lor, barierele administrative sau juridice naționale care împiedică o astfel de evoluție a evaluării cercetării și să ajute la prevenirea oricăror contradicții sau incompatibilități care ar putea exista între evaluarea cercetării, a cercetătorilor și a organizațiilor de cercetare în cadrul aplicării recomandărilor enumerate la punctul 27 din prezenta recomandare.

29. Statelor membre li se recomandă să promoveze măsuri, inclusiv mecanisme de consiliere și mentorat, prin care să aducă la cunoștința cercetătorilor, în special a celor aflați la începutul carierei, oportunitățile disponibile în toate sectoarele relevante și să promoveze o cultură a diversificării carierelor, pentru o mai bună dezvoltare personală și profesională. În acest sens, statelor membre și Comisiei li se recomandă să sprijine furnizarea de servicii de consiliere și sprijin pentru carieră, de exemplu, EURAXESS, pentru a stimula mobilitatea intersectorială, interdisciplinară și geografică, precum și crearea și dezvoltarea de activități antreprenoriale.

30. Statelor membre li se recomandă să promoveze un sistem de acces la carieră și de avansare în carieră echitabil, bazat pe egalitatea de șanse, incluziv, transparent, structurat și bazat pe egalitatea de gen pentru cercetătorii din mediul academic, până la nivelul posturilor de conducere. În acest sens, statelor membre li se recomandă să ia în considerare dezvoltarea unor sisteme de titularizare, care trebuie înțelese drept cadre definite în care un contract pe durată determinată prezintă perspectiva avansării pe un post permanent, sub rezerva unei evaluări pozitive.

Circulația echilibrată a talentelor și transformarea Uniunii într-o destinație atractivă

31. Statelor membre li se recomandă să ia măsuri ferme pentru a crea condiții favorabile. atractive și competitive pentru desfășurarea activităților de cercetare și inovare, precum și pentru revenirea cercetătorilor din străinătate. Printre astfel de măsuri s-ar putea număra, fără însă a se limita la acestea:

    (a) stimulente pentru sporirea atractivității activităților de cercetare, ținând seama de necesitatea unei concurențe loiale pentru talente;

    (b) simplificarea cerințelor juridice și administrative pe care trebuie să le îndeplinească cercetătorii;

    (c) investiții în sistemul de cercetare și inovare, inclusiv sprijin pentru activități de colaborare în rețea în interiorul și în afara Uniunii, pentru a conecta sistemele naționale de cercetare și inovare la rețelele europene de cercetare, precum și pentru a le integra în cadrul acestora și pentru a asigura o mai mare vizibilitate a capacităților naționale și a infrastructurilor de cercetare și tehnologice de nivel înalt;

    (d) schimb de bune practici în ceea ce privește crearea unui mediu de cercetare și inovare atractiv, sigur, incluziv, bazat pe egalitatea de gen și competitiv, chiar și în ceea ce privește îmbunătățirea remunerării, a condițiilor de muncă și a serviciilor, precum și reducerea barierelor administrative și lingvistice în cazul cercetătorilor străini și al cercetătorilor mobili la nivel internațional;

    (e) granturi pentru revenire și reinserție profesională și posturi atractive pentru cercetătorii care se întorc în țara de origine;

    (f) posibilitatea deținerii unui post dublu, în instituții din state membre diferite, promovând astfel transferul de cunoștințe, dezvoltarea competențelor, colaborarea și prevenind exodul talentelor;

    (g) explorarea opțiunilor pentru o abordare comună pentru personalul infrastructurilor de cercetare, în special în cazul unui consorțiu pentru infrastructuri europene de cercetare (ERIC).

    Comisiei i se recomandă să sprijine statele membre în eforturile lor, inclusiv prin facilitarea punerii în aplicare a sinergiilor atât dintre programele Uniunii, cât și dintre programele Uniunii și programele naționale.

32. Comisiei i se recomandă să întreprindă următoarele acțiuni menite să promoveze o circulație mai echilibrată a talentelor:

    (a) sprijinirea învățării reciproce în rândul statelor membre în vederea reformării sistemelor de cercetare și inovare ale acestora, inclusiv prin cereri de exprimare a interesului pentru a crea o comunitate de practică cuprinzând activități de formare și orientări pentru statele membre, pe baza unor parcursuri și soluții de succes care să permită o circulație mai echilibrată a talentelor;

    (b) monitorizarea fluxurilor de mobilitate, în interiorul Uniunii și cu țările terțe, prin intermediul unei hărți interactive a circulației talentelor, în cadrul observatorului carierelor în cercetare menționat la punctul 40 din prezenta recomandare;

    (c) facilitarea legăturilor transnaționale cu comunitățile din diaspora și cu comunitățile din țări terțe din domeniul cercetare și inovare și facilitarea atragerii talentelor sau a revenirii acestora, prin intermediul unei ramuri a platformei de talente a SEC menționate la punctul 33 din prezenta recomandare;

(d) promovarea unei circulații echilibrate a talentelor în cazul cercetătorilor la nivelul Uniunii prin consolidarea bazei de capital uman prin cercetători și inovatori care au competențe antreprenoriale și manageriale îmbunătățite și sunt mai bine pregătiți.

Acțiuni de sprijin pentru carierele în cercetare

33. Comisiei și statelor membre li se recomandă să ia măsuri adecvate pentru a consolida portalurile, serviciile și dimensiunea internațională ale EURAXESS, precum și să dezvolte platforma de talente a SEC sub forma unui ghișeu unic online pentru cercetătorii și instituțiile din toate sectoarele, dispunând de un nou cadru de guvernanță și de un rol de coordonare a organismelor și instituțiilor naționale relevante implicate în furnizarea de servicii. Platforma de talente a SEC ar trebui să permită:

(a) cercetătorilor să își gestioneze oportunitățile de învățare și formare, precum și carierele;

(b) institutelor de cercetare și inovare, angajatorilor și finanțatorilor să desfășoare activități de colaborare în rețea, să își gestioneze mai bine rezervele de talente, să colaboreze și să facă schimb de bune practici, facilitând totodată atragerea și păstrarea talentelor, dar și îmbunătățirea datelor, pentru o mai bună înțelegere a tendințelor în materie de mobilitate atât în interiorul Europei, cât și în afara acesteia.

Sfera de cuprindere a serviciilor ar putea fi extinsă pentru a include servicii de dezvoltare a talentelor și de gestionare a carierei, punându-se accent pe cercetătorii din toate sectoarele relevante ale societății, inclusiv din mediul academic.

34. Comisiei i se recomandă să asigure legăturile dintre platforma de talente a SEC și alte inițiative relevante la nivelul Uniunii și la nivel național, inclusiv Europass, ESCO și EURES, precum și interoperabilitatea acestora, să asigure un model îmbunătățit de guvernanță a platformei și a rețelei subiacente de centre de servicii pentru a răspunde mai bine nevoilor cercetătorilor și ale organizațiilor care desfășoară activități de cercetare.

35. Statelor membre și Comisiei li se recomandă să recunoască importanța aprobării și a punerii în aplicare a Cartei cercetătorilor menționate la punctul 36 din prezenta recomandare.

36. Noua Cartă a cercetătorilor prevăzută în anexa II la prezenta recomandare ar trebui să înlocuiască Carta și Codul cercetătorilor prevăzute în anexa la Recomandarea 2005/251/CE. Statelor membre și Comisiei li se recomandă să încurajeze aprobarea și punerea în aplicare a noii Carte a cercetătorilor de către angajatorii și finanțatorii din domeniul cercetării din toate sectoarele, inclusiv prin intermediul unor stimulente specifice, pentru ca aceasta să devină un instrument structural de sprijinire a cercetătorilor și a carierelor în cercetare.

37. Comisiei i se recomandă să adapteze Strategia în materie de resurse umane pentru cercetători sau orice alt mecanism similar viitor de punere în aplicare la noua Cartă a cercetătorilor și să asigure continuitatea în ceea ce privește instituțiile care au aprobat principiile anterioarei Carte și anteriorului Cod al cercetătorilor și care au aderat la Strategia în materie de resurse umane pentru cercetători, și anume considerând că acestea aprobă și Carta cercetătorilor prevăzută în anexa II la prezenta recomandare. Comisiei i se recomandă să aplice aceleași măsuri tranzitorii în cazul instituțiilor care au demarat procesul aferent Strategiei în materie de resurse umane pentru cercetători în temeiul anterioarei Carte a cercetătorilor și al anteriorului Cod al cercetătorilor.

38. Comisiei i se recomandă să revizuiască și să adapteze periodic toate instrumentele prin care se oferă sprijin pentru carierele în cercetare, în funcție de nevoile reale ale cercetătorilor, în coordonare cu statele membre și cu părțile interesate relevante.

39. Comisiei și statelor membre li se recomandă să încurajeze și să sprijine alianțele dintre instituțiile de învățământ superior, cum ar fi alianțele universităților europene, întregul sector european al învățământului superior, al cercetării și al inovării și toate părțile interesate implicate, pentru a desfășura proiecte-pilot cuprinzând activitățile relevante prevăzute în prezenta recomandare, în mod voluntar și pe baza unei abordări ascendente.

Monitorizarea carierelor în cercetare

40. Pe lângă sistemele generale de monitorizare a Spațiului european de cercetare, Comisiei și statelor membre li se recomandă să monitorizeze aspectele relevante ale carierelor în cercetare din Uniune și punerea în aplicare a prezentei recomandări prin intermediul unui observator specific în beneficiul comunității de cercetare, al factorilor de decizie, al administrației publice și al organizațiilor relevante de la nivel european și național. Observatorul ar trebui să sprijine o mai bună înțelegere de către cercetători a provocărilor și oportunităților și ar trebui, de asemenea, să promoveze atractivitatea organizațiilor care desfășoară activități de cercetare în Uniune pentru cele mai bune talente, garantând, în același timp, protecția datelor cu caracter personal pe tot parcursul punerii în aplicare.

41. Observatorul ar trebui să analizeze cu atenție și să identifice tipul de date de sprijin care ar fi relevante pentru observarea carierelor în cercetare. Acolo unde este posibil, ar trebui să fie avute în vedere și prioritizate conexiunile cu datele existente, cu scopul de a reduce sarcina administrativă pentru statele membre și pentru toate părțile interesate relevante. Statelor membre li se recomandă să coopereze în scopul colectării datelor relevante pentru punerea în aplicare a observatorului într-un mod eficient și durabil.

42. Comisia este invitată să propună, pe baza datelor furnizate de Observatorul carierelor în cercetare, măsuri suplimentare care să încurajeze și să promoveze dezvoltarea carierelor în cercetare.

43. Comisiei i se recomandă ca, în colaborare cu statele membre, să aibă în vedere identificarea unor legături relevante între Observatorul carierelor în cercetare și Observatorul european al sectorului învățământului superior propus în Strategia europeană pentru universități, după caz, și astfel să consolideze sinergiile dintre Spațiul european de cercetare și Spațiul european al educației.

44. Statelor membre și Comisiei li se recomandă să aibă în vedere adaptarea datelor colectate în contextul Regulamentului (UE) 2019/1700 la cerințele de date ale observatorului menționat la punctul 40 din prezenta recomandare.

Adoptată la Bruxelles, 18 decembrie 2023.

Pentru Consiliu
Președintele
T. RIBERA RODRÍGUEZ

ANEXA I

Exemple de ocupații exercitate de cercetători în toate sectoarele, încadrate la profilurile R1-R4

Ținând seama în mod corespunzător de competențele naționale și pentru a facilita utilizarea trimiterilor la profiluri în cazul tuturor posturilor vacante destinate în mod specific cercetătorilor, prezenta anexă oferă exemple pentru fiecare sector, în vederea comparabilității și a interoperabilității carierelor cercetătorilor între sectoare și țări în care aceștia ocupă un loc de muncă.

Entitățile în cauză ar trebui să fie conștiente de înțelesul definiției cercetătorului și al profilurilor acestuia, astfel cum reiese din punctele 1, 2, 5 și 6 din recomandare.

Tabelul 1

Exemple de ocupații în cadrul european pentru cariere în domeniul cercetării

R1 – cercetător debutant	R2 – cercetător recunoscut
doctoral candidate junior academic junior research analyst junior research engineer junior researcher/scientist junior scientific officer research apprentice/intern	junior academic junior lecturer junior research analyst junior research engineer junior researcher/scientist junior scientific officer postdoctoral researcher
R3 – cercetător consacrat	**R4 – cercetător principal**
accredited researcher assistant professor associate professor associate researcher principal investigator principal researcher/scientist reader research fellow research specialist scientific councillor senior academic senior lecturer senior research and development associate senior research engineer senior researcher/scientist senior scientific officer	chief scientific officer distinguished professor full professor principal investigator principal researcher/scientist reader research fellow research professor research specialist scientific councillor senior academic senior lecturer senior research and development associate senior research engineer senior researcher/scientist senior scientific officer

În ceea ce privește exemplele de ocupații ale cercetătorilor pentru profilurile R1-R4 enumerate în tabelul 1, este important de semnalat că:

— Exemplele nu sunt menite să fie exhaustive, ci ilustrative, indicând tipuri de grade profesionale ale cercetătorilor care se încadrează la profilurile R1-R4, în toate sectoarele.

— Exemplele constau doar în titluri în limba engleză, deși se recunoaște că titlurile vor fi diferite de la un sector la altul, de la o țară la alta, precum și de la o limbă la alta.

— Unele ocupații ale cercetătorilor se pot regăsi în mai multe profiluri din intervalul R1-R4, caz în care decizia privind profilul va depinde de nivelul de independență, experiență și recunoaștere.

— Decizia finală privind încadrarea într-un profil din intervalul R1-R4 a unei persoane și a unei ocupații va fi stabilită de la caz la caz și va depinde de persoana respectivă și de ocupație.

ANEXA II

Carta europeană a cercetătorilor

Carta europeană a cercetătorilor este un set de principii pe care se bazează dezvoltarea unor cariere atractive în cercetare pentru a sprijini excelența în activitățile de cercetare și inovare pe întreg teritoriul Europei. Carta europeană a cercetătorilor (denumită în continuare „Carta cercetătorilor") se axează pe drepturile și responsabilitățile cercetătorilor, ale angajatorilor, ale finanțatorilor și ale factorilor de decizie; ea cuprinde 20 de principii esențiale. Acestea sunt încadrate în următorii patru piloni:

(a) Etică, integritate, gen și știință deschisă;

(b) Evaluarea, recrutarea și avansarea în carieră a cercetătorilor;

(c) Condiții și practici de muncă;

(d) Cariere în cercetare și dezvoltarea talentelor.

Carta cercetătorilor se adresează tuturor cercetătorilor, sectoarelor care desfășoară activități de cercetare și organizațiilor-umbrelă din aceste sectoare (părți interesate), și anume:

(a) cercetătorilor din toate sectoarele – mediul academic, organizațiile publice și private care desfășoară activități de cercetare;

(b) angajatorilor cercetătorilor din sectorul public și privat;

(c) finanțatorilor cercetării și cercetătorilor din sectorul public și privat;

(d) factorilor de decizie responsabili de politicile relevante pentru Cartă.

Carta se adresează cercetătorilor din toate disciplinele, inclusiv științe, tehnologie, inginerie și matematică (ȘTIM), științe sociale și umaniste (SSH), și acoperă toate tipurile de cercetare, de la cercetarea de frontieră, specifică, strategică, aplicată și care poate fi exploatată comercial.

PILONUL 1 – ETICĂ, INTEGRITATE, GEN ȘI ȘTIINȚĂ DESCHISĂ

1. ETICĂ ȘI INTEGRITATEA CERCETĂRII
2. LIBERTATEA CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE
3. ȘTIINȚA DESCHISĂ
4. EGALITATEA DE GEN
5. ACCEPTAREA DIVERSITĂȚII
6. CERCETĂTORUL
7. LIBERA CIRCULAȚIE A CERCETĂTORILOR
8. DURABILITATEA CERCETĂRII

Acest pilon reunește principiile fundamentale ale Cartei cercetătorilor și angajamentul acesteia de a sprijini excelența în cercetare, înțeleasă în acest context ca fiind reprezentată de promovarea celor mai bune echipe și proiecte de cercetare, fără prejudecăți de gen și de altă natură. Se preconizează că principiile din cadrul acestui pilon vor contribui la punerea bazelor viziunii unui Spațiu european de cercetare revitalizat și vor reprezenta o sursă de inspirație atât pentru cercetătorii europeni, cât și pentru angajatorii, finanțatorii și factorii de decizie din domeniul european al cercetării. Dat fiind caracterul transversal al tuturor acestor valori, este de așteptat ca acestea să fie integrate și luate în considerare în procesul de aplicare a celorlalte principii.

1. Etică și integritatea cercetării ([1])

   Cercetătorii ar trebui să respecte norme etice stricte și să își desfășoare activitatea în condiții de onestitate, fiabilitate, obiectivitate, imparțialitate și independență, comunicare deschisă, cu aplicarea obligației de diligență, cu corectitudine și responsabilitate pentru viitoarele generații ale științei. Acestea constituie fundamentele unei cercetări responsabile și demne de încredere, fără ingerințe necuvenite (inclusiv ingerințe externe și conflicte de interese). Acestea constituie o condiție prealabilă pentru atingerea excelenței și reprezintă elementele pe care se întemeiază responsabilitatea cercetătorilor în ceea ce privește evitarea prejudecăților și a „scurtăturilor" metodologice.

([1]) Integritatea cercetării – Concluziile Consiliului (adoptate la 1 decembrie 2015) – documentul Consiliului 14853/15.

Cercetătorii ar trebui să adere la practicile etice recunoscute și la principiile etice fundamentale aplicabile disciplinei (disciplinelor) în care activează, precum și la standardele etice documentate în diferite coduri de etică instituite la nivel național, sectorial sau instituțional.

Responsabilitatea principală pentru integritatea cercetării le revine cercetătorilor înșiși. Cercetătorii ar trebui să fie sprijiniți prin intermediul unei culturi instituționale a integrității cercetării pentru a crea și respecta norme, proceduri și orientări, precum și prin activități de formare și de mentorat bazate pe schimbul de bune practici.

Pentru a promova bune practici în domeniul cercetării și o cultură a integrității cercetării, toate părțile interesate trebuie să aibă în vedere o serie de dimensiuni, cum ar fi: integritatea cercetării în mediile de cercetare; activități de formare și de consolidare a capacităților cu privire la integritatea cercetării; procese și politici de cercetare care înglobează integritatea cercetării; politicile în materie de date, publicare, diseminare, revizuire, evaluare și editare. În egală măsură, ar trebui instituite mecanisme de identificare, raportare și abordare a abaterilor de la buna conduită în cercetare.

Cercetătorii ar trebui să evite plagiatul de orice fel. O atenție deosebită ar trebui acordată principiilor coproprietății atunci când cercetarea se desfășoară în colaborare cu supraveghetori și/sau alți cercetători – în funcție de disciplină –, precum și normelor în materie de proprietate intelectuală. Acest lucru ar trebui să se aplice în toate etapele procesului de cercetare, inclusiv în ceea ce privește activitatea de concepere, de întocmire a cererilor de finanțare și de dezvoltare și de obținere a rezultatelor. Necesitatea de a valida observațiile prin demonstrarea reproductibilității constatărilor nu ar trebui interpretată drept plagiat, cu condiția ca datele care urmează să fie confirmate să fie menționate în mod explicit.

Valorile eticii și integrității sunt, de asemenea, foarte importante atunci când cercetătorii au un rol de supraveghere. Acestea ar trebui aplicate prompt pentru a asigura un mediu de cercetare sigur, incluziv și bazat pe egalitatea de gen pentru toți cei implicați și, în special, atunci când au loc discriminări, acte de hărțuire sexuală sau morală, cazuri de obstrucționare a învățării sau a activităților de cercetare ori însușirea personală nejustificată a datelor sau a rezultatelor.

2. Libertatea cercetării științifice

Libertatea cercetării științifice este o valoare de bază și un principiu esențial, aplicabile în comun cooperării în domeniul cercetării în interiorul Spațiului european de cercetare și cu parteneri internaționali. Cercetătorii ar trebui să își direcționeze activitățile de cercetare către binele omenirii și lărgirea frontierelor cunoașterii umane, beneficiind în același timp de libertatea de gândire, de opinie și de exprimare, de libertatea de a defini întrebările de cercetare, de libertatea de a identifica metodele prin care sunt soluționate problemele, de libertatea de a alege și de a dezvolta teorii, de libertatea de a pune sub semnul întrebării cunoștințele acceptate și de a prezenta idei noi, precum și de libertatea de a se asocia în cadrul unor organisme profesionale sau organisme academice reprezentative. Cercetătorii ar trebui să aibă dreptul de a disemina și publica rezultatele cercetărilor lor, inclusiv prin activități de formare și didactice. Cu toate acestea, cercetătorii ar trebui să recunoască limitările acestor libertăți, care ar putea să apară din cauza unor circumstanțe speciale ale activității de cercetare – inclusiv supraveghere/orientare/gestionare – sau din cauza unor constrângeri de ordin juridic sau operațional, de exemplu, din motive legate de drepturi de proprietate intelectuală ori din rațiuni bugetare sau de infrastructură.

3. Știința deschisă

Cercetătorii ar trebui să urmărească să se implice în toate aspectele științei deschise ([2]), iar angajatorii și finanțatorii lor ar trebui să îi sprijine în acest sens. Cercetătorii ar trebui să își partajeze rezultatele în mod deschis, de exemplu, sub formă de date cu acces liber și de date FAIR – ușor de găsit, accesibile, interoperabile și reutilizabile –, sub formă de publicații cu acces liber și prin software, modele și algoritmi cu acces liber. Aceștia ar trebui să ia măsuri pentru a asigura reproductibilitatea rezultatelor cercetării. Ar trebui, de asemenea, să urmărească să aplice metodologiile științei deschise și să se implice în evaluări *inter pares* cu acces liber. Angajatorii și finanțatorii ar trebui să sprijine, să furnizeze infrastructura și instrumentele necesare și să recompenseze o cultură veritabilă a științei deschise în întreaga Uniune, inclusiv generalizarea accesului liber la publicațiile academice, la datele provenite din cercetare și la alte rezultate ale cercetării – și anume urmând principiul „cât mai deschis cu putință, dar atât de închis cât este necesar” –, precum și difuzarea și adoptarea principiilor și practicilor științei deschise, luând în considerare în același timp diferențele dintre discipline și diferențele culturale, inclusiv multilingvismul, sprijinind dezvoltarea competențelor în domeniul științei deschise și dezvoltând și integrând și mai mult infrastructura și serviciile digitale de bază.

([2]) Tranziția către un sistem al științei deschise – Concluziile Consiliului (adoptate la 27 mai 2016) – documentul Consiliului 9526/16.

Inițiative științifice cetățenești

Cercetătorii ar trebui să integreze inițiativele științifice cetățenești în proiectele lor ori de câte ori acest lucru este posibil și relevant. Aceasta înseamnă implicarea cetățenilor în conceptualizarea, conceperea și punerea în aplicare a proiectelor de cercetare în domeniile ȘTIM și SSH. Acest tip de implicare reprezintă un mijloc ideal de a democratiza știința, de a consolida încrederea în știință și de a valorifica informațiile și capacitățile societale ample pentru a desfășura activități de cercetare și inovare de excelență.

4. Egalitatea de gen

Toate părțile interesate ar trebui să promoveze egalitatea de gen și echilibrul de gen în cadrul echipelor de cercetare, al organelor de conducere și de decizie, al comitetelor de recrutare și de promovare și al grupurilor consultative. Aici se include promovarea integrării dimensiunii de gen în conținutul activității de cercetare, didactice și de inovare, pentru a îmbunătăți calitatea științifică, nivelul de excelență și relevanța societală a cunoștințelor produse. Egalitatea de gen vizează, de asemenea, combaterea violenței de gen și a hărțuirii sexuale. Egalitatea de gen ar trebui înțeleasă dintr-o perspectivă interdependentă, în care diferitele sisteme de putere din cadrul categoriilor și identităților de gen și al altor categorii și identități sociale se intersectează și se consolidează reciproc. Schimbările instituționale durabile, dirijate prin planuri privind egalitatea de gen ([3]) sau similare, care permit raportarea adecvată a încălcărilor și cuprind sisteme de monitorizare și evaluare, constituie mecanisme adecvate de promovare a egalității de gen.

O componentă-cheie a transformării culturii unei organizații în direcția promovării egalității de gen este echilibrul dintre viața profesională și cea privată. Echilibrul dintre viața profesională și cea privată este relevant atât pentru femei, cât și pentru bărbați și implică asigurarea faptului că întregul personal este sprijinit în mod corespunzător pentru a avansa în carieră, în paralel cu responsabilitățile personale pe care le poate avea în afara locului de muncă, inclusiv responsabilitățile de îngrijire.

5. Acceptarea diversității

Un principiu de bază al Spațiului european de cercetare vizează luarea în considerare a diversității în sens larg, inclusiv, printre altele, a unor aspecte precum genul, originea rasială sau etnică, religia sau convingerile, diversitatea socială, handicapul, vârsta sau orientarea sexuală, precum și combaterea discriminării din orice motiv. Angajatorii și finanțatorii ar trebui să accepte diversitatea în rândul cercetătorilor lor, deoarece diferitele experiențe de viață aduc perspective de valoare proiectelor de cercetare. De asemenea, diversitatea participanților poate contribui la rezultatele cercetării care se aplică în cadrul societăților diverse în care trăim, ducând la îmbunătățirea acestora. În special pe tărâmul științei, este necesară, de asemenea, recunoașterea prejudecăților inconștiente, de exemplu în ceea ce privește sarcinile de angajare, promovare și examinare, precum și compensarea acestora, atunci când este posibil.

6. Cercetătorul

Toți cercetătorii sunt implicați în conceperea sau crearea de noi cunoștințe științifice bazate pe concepte sau ipoteze originale. Cercetătorii sunt profesioniști a căror activitate ar trebui apreciată, indiferent de sectorul în care își desfășoară activitatea. Acest lucru ar trebui să se manifeste de la începutul carierei lor, și anume la nivel postuniversitar, și ar trebui să includă toate nivelurile, oricare ar fi clasificarea națională a acestora.

Angajatorii și finanțatorii ar trebui să încurajeze și să sprijine parcursurile profesionale neliniare și axate pe cariere multiple, care trebuie înțelese ca parcursuri caracterizate de mobilitate geografică, disciplinară, intersectorială și interorganizațională – de exemplu, detașări. De asemenea, aceștia ar trebui să încurajeze parcursurile profesionale hibride care combină simultan sectoare diferite și care ar trebui luate în considerare pe picior de egalitate cu parcursurile profesionale liniare.

Atitudinea profesională

Cercetătorii ar trebui să fie familiarizați cu obiectivele strategice urmărite de mediul lor de cercetare și cu mecanismele de finanțare aplicabile și ar trebui să solicite și să obțină toate aprobările necesare înainte de a-și începe cercetarea sau de a accesa resursele puse la dispoziție. Cercetătorii ar trebui să depună toate eforturile pentru a se asigura că cercetarea lor este relevantă pentru societate prin facilitarea unei înțelegeri îmbunătățite asupra lumii și că nu dublează în mod inutil o cercetare desfășurată anterior în altă parte. Acest lucru implică valorificarea eficientă a rezultatelor cercetării.

([3]) A se vedea Comunicarea Comisiei către Parlamentul European, Consiliu, Comitetul Economic și Social European și Comitetul Regiunilor – O Uniune a egalității: Strategia privind egalitatea de gen 2020-2025, COM(2020) 152 final.

Între cercetători și angajatori, finanțatori sau supraveghetori ar trebui să existe o comunicare clară atunci când un proiect de cercetare este amânat, redefinit sau finalizat; în cazul în care un proiect de cercetare urmează să înceteze mai devreme sau să fie suspendat, indiferent de motiv, acest lucru ar trebui să fie anunțat.

Răspundere

Răspunderea înseamnă asumarea responsabilității pentru acțiunile proprii întreprinse pe parcursul desfășurării cercetării. Cercetătorii trebuie să fie conștienți de faptul că răspund față de angajatori, finanțatori sau alte organisme publice sau private conexe, precum și față de societate, în acest din urmă caz din motive preponderent etice. Cercetătorii finanțați din fonduri publice răspund, de asemenea, pentru utilizarea eficientă a banilor contribuabililor. Prin urmare, aceștia ar trebui să adere la principiile unei bune gestiuni financiare în condiții de transparență și de eficiență, precum și să coopereze în cadrul eventualelor audituri autorizate cu privire la cercetarea lor, indiferent dacă acestea sunt desfășurate de angajatorii/finanțatorii lor sau de comitete de etică. În acest sens, aceștia au obligația de a servi drept exemplu de comportament etic atât pentru omologii lor, cât și pentru societate în general.

Metodele de colectare și analiză, rezultatele și, după caz, detaliile cu privire la date ar trebui să fie disponibile în scopul unui control intern sau extern, ori de câte ori este necesar și conform solicitărilor autorităților competente. Acest lucru este important și pentru a asigura date deschise și a sprijini asigurarea reproductibilității rezultatelor.

7. Libera circulație a cercetătorilor

Angajatorii și finanțatorii ar trebui să promoveze libera circulație a cercetătorilor, a cunoștințelor științifice și a tehnologiilor, atrăgând totodată talentele și evitând potențialul exod al acestora. Aceștia ar trebui să recunoască importanța mobilității geografice, interinstituționale, intersectoriale, interdisciplinare și transdisciplinare ca mijloc important de îmbunătățire a cunoștințelor și de dezvoltare profesională în orice etapă a carierei unui cercetător, precum și să aprecieze și să recunoască pe deplin orice experiență de mobilitate în cadrul sistemului de avansare în carieră/evaluare profesională a acestora. Mobilitatea virtuală s-a dovedit a fi o resursă valabilă, putând fi și ea luată în considerare. Acest lucru presupune, de asemenea, instituirea instrumentelor administrative necesare care să permită atât transferabilitatea granturilor, cât și a prestațiilor de securitate socială, în conformitate cu legislația națională.

8. Durabilitatea cercetării

Cercetătorii, angajatorii și finanțatorii ar trebui să promoveze punerea în aplicare durabilă a activităților de cercetare în conformitate cu inițiative de politică actuale și viitoare menite să ducă la propășirea societății, cum ar fi Pactul verde european, Agenda 2030 a Organizației Națiunilor Unite și obiectivele de dezvoltare durabilă. Cercetătorii ar trebui să fie sprijiniți prin intermediul unei culturi instituționale în materie de management durabil al cercetării, precum și prin activități de formare și de mentorat bazate pe schimbul de bune practici. De asemenea, aceștia ar trebui să preia inițiativa cu privire la reducerea emisiilor de carbon din activitatea pe care o desfășoară, într-un mod care să ofere un exemplu pozitiv celorlalți actori din cadrul comunității de cercetare.

Se poate utiliza ca punct de referință documentul „MSCA Green Charter” (Carta verde a acțiunilor Marie Skłodowska-Curie), elaborat de Comisia Europeană în cadrul acțiunilor Marie Skłodowska-Curie (MSCA).

PILONUL 2 – EVALUAREA, RECRUTAREA ȘI AVANSAREA ÎN CARIERĂ A CERCETĂTORILOR

1. EVALUAREA CERCETĂTORILOR
2. RECRUTARE
3. SELECȚIE
4. AVANSARE ÎN CARIERĂ

Prin evaluarea cercetătorilor ar trebui să se asigure o recunoaștere și o recompensare egală a carierelor cercetătorilor, indiferent de sectorul în care sunt angajați sau își desfășoară activitatea, în temeiul unei abordări imparțiale, bazate pe talente. Politicile echitabile în materie de recrutare și selecție a cercetătorilor sunt esențiale pentru realizarea unei piețe deschise a forței de muncă pentru cercetători, contribuind la dezvoltarea Spațiului european de cercetare.

1. Evaluarea cercetătorilor

Evaluarea cercetătorilor ar trebui să permită evaluarea performanței cercetătorilor și a activităților de cercetare, pentru a obține un nivel cât mai înalt de calitate și de impact. Acest lucru presupune recunoașterea unor activități, practici și rezultate din ce în ce mai diverse ale cercetării. Prin urmare, evaluarea ar trebui să se bazeze în primul rând pe o analiză calitativă – în cazul căreia evaluarea *inter pares* și evaluarea efectuată de alți experți pertinenți sunt esențiale –, susținută de utilizarea responsabilă a indicatorilor cantitativi. Contribuțiile la inovare ar trebui, de asemenea, să fie recunoscute, în special în cazul candidaților din mediul industrial.

Angajatorii și finanțatorii ar trebui să sprijine un sistem de evaluare și recompensare a cercetătorilor care să ia în considerare calitatea generală a impactului acestora din urmă asupra societății, a științei și a inovării, diversitatea activităților realizate, practicile științei deschise, precum și valoarea mobilității geografice, interdisciplinare și intersectoriale. Un astfel de sistem ar trebui:

(a) să se bazeze pe o analiză calitativă imparțială realizată *inter pares*, precum și de către experți pertinenți, susținută de utilizarea responsabilă a indicatorilor cantitativi;

(b) să recompenseze calitatea și diferitele efecte potențiale ale cercetării asupra societății, a științei și a inovării;

(c) să recunoască diversitatea rezultatelor, printre altele, publicații, seturi de date, software, metodologii, protocoale, brevete, modele, teorii, algoritmi, fluxuri de lucru, expoziții, strategii, contribuții la elaborarea de politici; diversitatea activităților, printre altele, mentorat, supravegherea cercetării, roluri de conducere, antreprenoriat, gestionarea datelor FAIR – „ușor de găsit, accesibile, interoperabile și reutilizabile" –, evaluări *inter pares*, activitatea didactică, valorificarea cunoștințelor, cooperarea dintre industrie și mediul academic, sprijin pentru elaborarea de politici bazate pe date concrete, interacțiunea cu societatea, gestionare și conducere, supraveghere, munca în echipă, serviciile aduse societății, comunicarea științifică și rigoarea metodologică, precum și o diversitate de practici, printre altele, știința deschisă, schimbul timpuriu de cunoștințe și de date și colaborarea deschisă, pe lângă toate experiențele de mobilitate, inclusiv geografică, intersectorială, interinstituțională, interdisciplinară și transdisciplinară;

(d) să garanteze că activitatea cercetătorilor respectă standarde ridicate de etică și integritate, se desfășoară conform unor reguli de conduită adecvate și apreciază bunele practici, inclusiv practicile deschise de partajare a rezultatelor cercetării și a metodologiilor de cercetare, ori de câte ori este posibil;

(e) să utilizeze criterii și proceduri de evaluare care respectă varietatea disciplinelor de cercetare și a contextelor naționale;

(f) să sprijine diversitatea profilurilor de cercetător și a parcursurilor profesionale și să aprecieze contribuțiile individuale, dar și rolul echipelor, al activităților de colaborare și al interdisciplinarității;

(g) să asigure echilibrul de gen, egalitatea de gen, egalitatea de șanse și incluziunea.

Pentru a asigura coerență în punerea în aplicare a acestor principii, angajatorii și finanțatorii ar trebui să încurajeze formarea continuă a actorilor implicați în procesul de evaluare și de recompensare.

2. Recrutare

În conformitate cu principiile libertății academice și autonomiei instituționale, angajatorilor și finanțatorilor li se recomandă să instituie proceduri de recrutare și selecție deschise, transparente și bazate pe merite, fără a penaliza întreruperile de carieră sau parcursurile neliniare, hibride și axate pe cariere multiple. Aceste proceduri ar trebui să fie direcționate spre excelență, egalitate de gen și diversitate și să fie adaptate tipului postului anunțat. În anunțurile de angajare ar trebui să se regăsească o descriere cuprinzătoare a cunoștințelor și competențelor necesare, inclusiv o descriere a condițiilor de muncă și a drepturilor aferente, a perspectivelor de dezvoltare a carierei și o prezentare generală a calendarului. Înainte de selecție, candidații ar trebui să fie informați cu privire la procesul de recrutare și criteriile de selecție, numărul de posturi disponibile și perspectivele de dezvoltare a carierei. Membrii comitetului ar trebui, de asemenea, să fie informați și instruiți cu privire la principiile de recrutare echitabilă.

Variații în cronologia CV-urilor

Întreruperile de carieră sau variațiile în cronologia CV-urilor nu ar trebui să fie penalizate, ci considerare drept evoluție în carieră și, prin urmare, drept o potențială contribuție de valoare la dezvoltarea profesională a cercetătorilor către un parcurs profesional multidimensional. Prin urmare, candidaților ar trebui să li se permită să prezinte CV-uri bazate pe dovezi care să reflecte o gamă reprezentativă de realizări și calificări adecvate postului pentru care își depun candidatura.

Vechimea în funcție

Nivelul calificărilor solicitate ar trebui să corespundă cerințelor postului și să nu fie stabilite astfel încât să constituie o barieră la înscriere. Evaluarea calificărilor ar trebui să se axeze pe aprecierea realizărilor persoanei, mai degrabă decât pe circumstanțele acestor realizări ori pe reputația instituției în care au fost dobândite calificările în cauză. Întrucât calificările profesionale pot fi dobândite într-un stadiu incipient al unei cariere îndelungate, modelul de dezvoltare profesională pe tot parcursul vieții ar trebui, de asemenea, să fie încurajat și recunoscut.

3. Selecție

Ca parte a recrutării, procesul de selecție ar trebui să ia în considerare întreaga experiență a candidaților. Deși accentul se pune pe potențialul de ansamblu al candidaților în calitate de cercetători, ar trebui să se țină seama și de creativitatea acestora – astfel cum a fost evaluată pe baza metodelor, a abordărilor și a rezultatelor lor de cercetare inovatoare – și de nivelul lor de independență. Comitetele de selecție ar trebui să reunească expertiză, competențe și experiențe diverse și relevante pentru a evalua candidatul. Ar trebui, de asemenea, să existe un echilibru de gen adecvat la nivelul comitetelor de selecție și, acolo unde este cazul și este posibil, acestea ar trebui să includă membri din diferite sectoare – publice și private – și discipline, precum și din alte țări. Ori de câte ori este posibil, ar trebui să se utilizeze o gamă largă de practici de selecție, cum ar fi evaluarea realizată de un expert extern, interviul față în față și interviul online. Membrii comitetelor de selecție ar trebui să fie pregătiți în mod corespunzător, în special în vederea reducerii la minimum a prejudecăților de gen sau a oricăror alte posibile prejudecăți inconștiente. După procesul de selecție, toți candidații ar trebui să fie informați cu privire la punctele forte și punctele slabe ale candidaturii lor.

Nediscriminare

Angajatorii și finanțatorii cercetătorilor nu ar trebui să discrimineze cercetătorii în niciun fel pe criterii de gen, vârstă, origine etnică, națională sau socială, religie sau convingeri, orientare sexuală, limbă, handicap, opinii politice ori statut social sau economic.

4. Avansare în carieră

Angajatorii și finanțatorii ar trebui să introducă pentru toți cercetătorii, inclusiv pentru cercetătorii cu calificări superioare, sisteme de evaluare/apreciere pentru evaluarea periodică a sarcinilor acestora, în mod transparent, de către un comitet independent care, în cazul cercetătorilor cu calificări superioare, este, de preferință, un comitet internațional. Parcursurile profesionale neliniare și axate pe cariere multiple, caracterizate prin mobilitate geografică, sectorială și interorganizațională, sau parcursurile hibride, caracterizate de o combinație simultană de sectoare, merită să fie recunoscute pe deplin și luate în considerare pe picior de egalitate cu parcursuri profesionale liniare – care trebuie înțelese drept cariere care urmează o linie dreaptă de evoluție de la un post la altul, de obicei în cadrul aceluiași domeniu sau al aceleiași discipline.

Astfel de proceduri de evaluare și de apreciere ar trebui să țină seama în mod corespunzător de potențialul de ansamblu al cercetătorilor, de creativitatea lor în materie de cercetare, de rezultatele cercetărilor lor – de exemplu, publicații, date, software, modele, algoritmi, metode, protocoale, brevete, contribuții la elaborarea de politici –, de activitățile lor – de exemplu, gestionare și conducere, activitate didactică/predare, evaluare *inter pares*, supraveghere, mentorat, antreprenoriat, valorificare a cunoștințelor, colaborare națională sau internațională, atribuții de natură administrativă, servicii aduse societății, comunicare științifică și interacțiune cu societatea –, de comportamentul lor în activitatea de cercetare – de exemplu, practicile în materie de etică și integritate, rigoarea metodologică, schimbul timpuriu de date și de cunoștințe, colaborarea deschisă – și de mobilitatea lor; de asemenea, acestea ar trebui avute în vedere în contextul avansării în carieră.

Pentru a consolida carierele în mediul academic, până la posturile de conducere, este necesar un sistem de acces la carieră și de avansare în carieră transparent, structurat, incluziv și bazat pe egalitatea de gen. În acest scop, la nivelul statelor membre și al organizațiilor care desfășoară activități de cercetare, ar putea fi avută în vedere dezvoltarea unor sisteme de titularizare – care trebuie înțelese drept cadre definite în care un contract pe durată determinată prezintă perspectiva avansării pe un post permanent, sub rezerva unei evaluări pozitive.

Coautoratul

Coautoratul ar trebui să fie perceput în mod favorabil de instituții atunci când evaluează personalul, ca o dovadă a abordării constructive față de desfășurarea activității de cercetare. Prin urmare, angajatorii și finanțatorii ar trebui să elaboreze strategii, practici și proceduri prin care să ofere cercetătorilor, inclusiv celor aflați la începutul carierei în cercetare, condițiile-cadru necesare pentru ca aceștia să beneficieze de dreptul de a fi recunoscuți, enumerați și/sau citați, în contextul contribuțiilor lor efective, în calitate de coautori de lucrări, coinventatori de brevete etc. sau de a-și publica rezultatele cercetării independent de supraveghetorii lor. De asemenea, aceștia ar trebui să ofere cercetătorilor, în special celor aflați la început de carieră, activități de formare și ateliere cu privire la practicile etice privind calitatea de autor, inclusiv în ceea ce privește înțelegerea contribuțiilor individuale și a drepturilor și responsabilităților care le revin.

Recunoașterea experienței de mobilitate

Orice experiență relevantă de mobilitate, de exemplu, o ședere într-o altă țară/regiune sau situarea într-un alt cadru de cercetare – public sau privat – sau trecerea de la o disciplină la alta ori de la un sector la altul, fie în cadrul unei formări inițiale în materie de cercetare, fie într-o etapă ulterioară a carierei în cercetare, sau o experiență de mobilitate virtuală, ar trebui considerată o contribuție de valoare la dezvoltarea profesională a unui cercetător.

PILONUL 3 - CONDIȚII ȘI PRACTICI DE MUNCĂ

1. CONDIȚII DE MUNCĂ, FINANȚARE ȘI SALARII
2. STABILITATEA LOCULUI DE MUNCĂ
3. OBLIGAȚII CONTRACTUALE ȘI JURIDICE
4. DISEMINAREA ȘI EXPLOATAREA REZULTATELOR

Îmbunătățirea condițiilor de muncă ale cercetătorilor ar trebui să se regăsească în centrul cadrului de politică al Uniunii privind carierele în cercetare. În acest domeniu sunt propuse mai multe acțiuni care să contribuie la stabilitatea locului de muncă și la definirea drepturilor și obligațiilor cercetătorilor în materie de muncă, sub rezerva legislației și a circumstanțelor naționale. Se subliniază, de asemenea, necesitatea ca angajatorii și finanțatorii să instituie o cultură a cercetării pentru excelența în cercetare și să faciliteze dezvoltarea unei comunități prospere de cercetători.

1. Condiții de muncă, finanțare și salarii

Angajatorii și finanțatorii ar trebui să se asigure că prin condițiile de muncă pentru cercetători, inclusiv pentru cei cu dizabilități, se oferă, după caz, flexibilitatea și accesibilitatea considerate esențiale pentru desfășurarea cu succes a activităților de cercetare în conformitate cu legislația și cu circumstanțele naționale aplicabile și cu dispozițiile contractelor colective de muncă încheiate la nivel național sau sectorial. Aceștia ar trebui să urmărească să asigure condiții de muncă vizând combinarea vieții personale, a familiei, a îngrijirii, a sănătății, a siguranței și a stării de bine generale, fără a afecta carierele în cercetare. O atenție deosebită ar trebui acordată, printre altele, formulelor flexibile de lucru, muncii cu fracțiune de normă, muncii la distanță și concediului sabatic, precum și dispozițiilor financiare și administrative necesare care să reglementeze astfel de formule. Angajatorii ar trebui să asigure un mediu și condiții de lucru care promovează sănătatea mintală și starea de bine fizică a cercetătorilor, inclusiv proceduri adecvate pentru prevenirea și combaterea violenței de gen, inclusiv a hărțuirii sexuale.

Mediul de cercetare

Angajatorii și finanțatorii cercetătorilor ar trebui să se asigure că este creat cel mai stimulant mediu de cercetare sau de formare în domeniul cercetării, care oferă echipamente, instalații și oportunități adecvate, inclusiv pentru colaborarea la distanță prin intermediul rețelelor de cercetare, precum și cel mai înalt nivel de sănătate și siguranță în conformitate cu reglementările de la nivelul Uniunii, reglementările naționale și cele sectoriale. Finanțatorii ar trebui să se asigure că sunt furnizate resurse adecvate în sprijinul programului de lucru convenit. În special, este importantă existența de personal auxiliar calificat – de exemplu, responsabili și administratori în materie de cercetare.

Reclamații/apeluri

Angajatorii și finanțatorii cercetătorilor ar trebui să instituie proceduri adecvate, în conformitate cu normele și reglementările relevante ale dreptului intern, al Uniunii sau internațional, eventual sub forma unui mediator imparțial care să trateze reclamațiile/apelurile cercetătorilor, inclusiv cele privind conflictele dintre supraveghetori și cercetătorii debutanți (R1)/cercetătorii recunoscuți (R2). Aceste proceduri ar trebui să ofere întregului personal de cercetare asistență confidențială și informală pentru soluționarea conflictelor, a litigiilor și a plângerilor legate de muncă, cu scopul de a promova tratamentul corect și echitabil în cadrul instituției și de a îmbunătăți calitatea generală a mediului și condițiilor de lucru.

Participare la guvernanța organizațională

Angajatorii și finanțatorii cercetătorilor ar trebui să recunoască faptul că este pe deplin legitim și chiar de dorit ca cercetătorii să fie reprezentați în organele relevante de informare, consultare și decizionale ale instituțiilor pentru care lucrează, pentru a-și proteja și promova interesele individuale și colective și pentru a contribui în mod activ la funcționarea instituției.

Finanțare și salarii

Angajatorii și finanțatorii cercetătorilor ar trebui să se asigure că cercetătorii, indiferent de statutul lor, beneficiază de condiții de remunerare echitabile și atractive – finanțare și salarii –, însoțite de prestații de securitate socială adecvate și echitabile – inclusiv prestații de boală, de asistență medicală și parentale, drepturi la pensie și prestații de șomaj, prestații pentru limită de vârstă și prestații de urmaș, prestații de invaliditate și prestații pentru accidente și boli profesionale – în conformitate cu legislația națională aplicabilă și cu dispozițiile contractelor colective de muncă încheiate la nivel național sau sectorial. Ar trebui incluși aici cercetătorii din toate etapele carierei, inclusiv cercetătorii debutanți (R1), în conformitate cu statutul juridic, performanța și nivelul calificărilor și responsabilităților acestora. Cercetătorii ar trebui să fie informați cu privire la drepturile și obligațiile lor pentru a înțelege modul în care le sunt impozitate salariile și ar trebui să beneficieze de informații transparente cu privire la drepturile de protecție socială, cum ar fi dreptul la pensie în cadrul regimului național de pensii.

2. Stabilitatea locului de muncă

Angajatorii și finanțatorii ar trebui să întreprindă acțiuni ferme pentru combaterea fenomenului precarității și să sprijine securitatea și stabilitatea locurilor de muncă. Aceasta ar putea include, pe bază voluntară, stabilirea unui prag maxim pentru numărul de contracte pe durată determinată pentru fiecare organizație în parte din totalul resurselor umane reprezentate de cercetători. Ori de câte ori sunt îndeplinite sarcini de cercetare permanente, pe termen lung sau cu recurență ridicată, se recomandă contractele de muncă pe durată nedeterminată ca instrument adecvat. Cercetătorii cu contracte pe durată determinată ar trebui să beneficieze de servicii specifice de dezvoltare a carierei și de consiliere vizând asigurarea continuității carierei.

Cercetători aflați la început de carieră (R1-R2)

Precaritatea locurilor de muncă constituie o problemă deosebită în mediul academic. Pentru a contracara această situație, se recomandă să se pună în aplicare – sub rezerva legislației și a circumstanțelor naționale – măsuri specifice de sprijinire a cercetătorilor aflați la început de carieră, mai precis să li se ofere cercetătorilor debutanți (R1) protecție socială și condiții de muncă aplicabile cercetătorilor aflați în alte etape ale carierei, precum și venituri adecvate, promovându-se implicarea cercetătorilor aflați la început de carieră în echipe de cercetare, evitându-se solicitarea de sarcini care nu au legătură cu formarea lor științifică și recunoscându-se mobilitatea interinstituțională, intersectorială, interdisciplinară și geografică, inclusiv mobilitatea virtuală. În plus, instituțiile împuternicite să facă numiri ar trebui să stabilească norme clare și orientări explicite pentru recrutarea și numirea cercetătorilor recunoscuți (R2), inclusiv durata maximă și obiectivele acestor numiri. Astfel de orientări a trebui să ia în considerare perioada de timp petrecută cu ocazia ocupării unui post anterior de cercetător postdoctorand în alte instituții și să țină cont de faptul că statutul de postdoctorand ar trebui să fie provizoriu, scopul principal urmărit fiind acela de a oferi oportunități suplimentare de dezvoltare profesională pentru o carieră în cercetare în contextul perspectivelor unei cariere pe termen lung în baza unui contract pe durată determinată sau a unei titularizări.

Angajatorii și finanțatorii ar trebui să depună toate eforturile pentru a informa cercetătorii aflați la început de carieră cu privire la oportunitățile de carieră, în cadrul și în afara mediului academic, oferind o dezvoltare profesională amplă, în special în etapa R2, perspective de carieră mai transparente și mai previzibile, precum și oportunități de învățare prin muncă într-o diversitate de sectoare.

3. Obligații contractuale și juridice

Cercetătorii de la toate nivelurile ar trebui să fie familiarizați cu reglementările naționale, sectoriale sau instituționale care reglementează formarea și condițiile de muncă. Se includ aici reglementările în materie de drepturi de proprietate intelectuală, precum și cerințele și condițiile instituite de orice sponsor sau de finanțatori, indiferent de natura contractului lor. Angajatorii și finanțatorii ar trebui să pună la dispoziție copii ale acestor documente în limba engleză. Cercetătorii ar trebui să adere la aceste reglementări prin prezentarea rezultatelor solicitate – de exemplu, dizertații, publicații, brevete, rapoarte, produse noi etc. –, astfel cum se prevede în clauzele și condițiile contractului sau ale unui document echivalent.

Dat fiind accentul tot mai mare pus pe securitatea cunoștințelor, cercetătorii ar trebui să adopte în permanență practici de lucru sigure, în conformitate cu legislația relevantă de la nivel național și de la nivelul Uniunii, inclusiv să ia măsurile de precauție necesare în materie de sănătate și siguranță, precum și în materie de redresare în urma atacurilor la adresa securității cibernetice și a dezastrelor legate de tehnologia informației, de exemplu, prin elaborarea de strategii adecvate privind copiile de rezervă. De asemenea, aceștia ar trebui să fie familiarizați cu cerințele juridice actuale de la nivel național și de la nivelul Uniunii privind protecția datelor și a confidențialității și să ia măsurile necesare pentru a le îndeplini în permanență.

4. Diseminarea și exploatarea rezultatelor

Știința deschisă ar trebui să fie practicată de toți cercetătorii pentru a se asigura, în conformitate cu formulele contractuale la care sunt parte, că rezultatele cercetărilor lor sunt diseminate, sunt puse la dispoziție și exploatate în mod deschis, de exemplu, sunt comunicate, transferate în alte cadre de cercetare și, după caz, comercializate. Este de așteptat ca cercetătorii cu calificări superioare să preia inițiativa pentru a se asigura că cercetarea este fructuoasă și că rezultatele sunt exploatate comercial și/sau sunt puse la dispoziția publicului ori de câte ori se ivește ocazia.

În acest sens, cercetătorii ar trebui sprijiniți de angajatori și finanțatori prin formare pentru dobândirea competențelor relevante și prin asigurarea accesului la finanțarea, infrastructurile și sprijinul adecvate. Implicarea cercetătorilor în practici în materie de știință deschisă ar trebui să fie recunoscută, stimulată și recompensată de angajatori și finanțatori în procesul de recrutare, de avansare în carieră și de evaluare a programelor de finanțare.

Active intelectuale, inclusiv drepturi de proprietate intelectuală

Angajatorii și finanțatorii ar trebui să se asigure că cercetătorii aflați în toate etapele carierei primesc compensații adecvate pentru beneficiile care rezultă din exploatarea – dacă este cazul – a rezultatelor activităților lor de cercetare și inovare, garantând, după caz, coproprietatea drepturilor de proprietate intelectuală, cum ar fi drepturile de autor. Angajatorii și finanțatorii ar trebui să trateze acest aspect în mod explicit în strategia lor de gestionare a activelor intelectuale și ar trebui să pună strategia la dispoziția publicului. Strategia de gestionare a activelor intelectuale ar trebui să acopere crearea, gestionarea, drepturile de proprietate și utilizarea tuturor tipurilor de active intelectuale – inclusiv publicații evaluate *inter pares*, date, know-how, standarde – și să sprijine practicile științei deschise.

Strategia ar trebui să menționeze explicit dispozițiile în materie de drepturi de proprietate și de acces conferite cercetătorilor și/sau, după caz, angajatorilor acestora sau altor părți, inclusiv partenerilor din industrie, astfel cum se poate prevedea în acorduri de colaborare specifice sau în alte tipuri de acorduri.

Implicarea publicului

Cercetătorii ar trebui să se asigure că activitățile lor de cercetare sunt aduse la cunoștința societății în ansamblu într-o formă în care să fie înțelese de nespecialiști, îmbunătățind astfel înțelegerea științei în rândul publicului. Colaborarea directă cu societatea civilă și cu cetățenii va ajuta cercetătorii să înțeleagă mai bine interesul public față de prioritățile în materie de cercetare și preocupările publicului, precum și să valorifice potențialul proiectării și creării în comun cu societatea, după caz.

PILONUL 4 - CARIERE ÎN CERCETARE ȘI DEZVOLTAREA TALENTELOR

1. VALORIFICAREA DIVERSITĂȚII CARIERELOR ÎN CERCETARE
2. DEZVOLTAREA CARIEREI ȘI CONSILIERE ÎN CARIERĂ
3. DEZVOLTARE PROFESIONALĂ CONTINUĂ
4. SUPRAVEGHERE ȘI MENTORAT

Comunitatea de cercetare este caracterizată de o diversitate a talentelor, a competențelor, a aptitudinilor, a capacităților și a rolurilor. Cu cât se încurajează și dezvoltă mai mult aceste talente, cu atât va fi mai bună calitatea cercetării și va spori relevanța societală a cunoștințelor produse. Încurajarea dezvoltării profesionale continue și a formării pentru dobândirea de competențe este necesară pentru a păstra competențele și pentru a oferi cercetătorilor o gamă largă de oportunități în materie de carieră în sectorul public și privat.

1. Valorificarea diversității carierelor în cercetare

Angajatorii și finanțatorii ar trebui să recunoască faptul că cercetătorii pot avea cariere extrem de diverse atât în cercetare, cât și în alte funcții. De regulă, diversificarea include mobilitatea în toate formele sale: mobilitatea internațională/intranațională, intersectorială, interinstituțională, interdisciplinară și transdisciplinară și virtuală. Acest lucru presupune o evaluare a calității întemeiată în mai mare măsură pe talente și mai sensibilă la diversitate, promovând utilizarea responsabilă a parametrilor, ținând seama de diversitatea contribuțiilor și de impactul potențial al acestora, de diversitatea activităților și a practicilor, cum ar fi activitățile didactice și competențele, evaluarea *inter pares*, gestionarea și conducerea, supravegherea, mentoratul, valorificarea cunoștințelor, precum și activitățile de transfer de tehnologie, antreprenoriatul și colaborarea cu industria, crearea de activități vizând elaborarea de politici bazate pe date concrete, comunicarea științifică și interacțiunea cu societatea, practicile științei deschise, știința în echipă, printre altele, precum și mobilitatea.

Angajatorii și finanțatorii ar trebui să instituie măsuri prin care să aducă la cunoștința cercetătorilor, în special a celor aflați la început de carieră, oportunitățile disponibile în toate sectoarele relevante și să promoveze o cultură a diversificării carierelor, pentru o mai bună dezvoltare personală și profesională. În acest sens vor fi necesare servicii de consiliere, mentorat și sprijin pentru carieră pentru a stimula mobilitatea intersectorială, interdisciplinară și geografică, precum și crearea și dezvoltarea de activități antreprenoriale.

2. Dezvoltarea carierei și consiliere în carieră

Angajatorii și finanțatorii cercetătorilor ar trebui să elaboreze, preferabil în cadrul sistemului lor de gestionare a resurselor umane, o strategie specifică de dezvoltare a carierei pentru cercetătorii aflați în toate etapele carierei lor, indiferent de situația lor contractuală, inclusiv pentru cercetătorii care își desfășoară activitatea în baza unor contracte pe perioadă determinată. În acest context, cercetătorii ar trebui să fie sprijiniți să elaboreze un plan individual de carieră pentru a identifica activitățile de formare și de cercetare necesare pentru a-și atinge obiectivele profesionale. Acesta ar trebui să prevadă disponibilitatea unor mentori implicați în oferirea sprijinului și a orientărilor necesare în vederea dezvoltării personale și profesionale a cercetătorilor, motivându-i și contribuind la reducerea eventualei nesiguranțe în privința viitorului lor profesional. Toți cercetătorii ar trebui să se familiarizeze cu aceste dispoziții și formule și să acționeze proactiv și responsabil în ceea ce privește dezvoltarea propriei cariere.

Angajatorii și finanțatorii ar trebui să asigure, fie în instituțiile în cauză, fie în colaborare cu alte structuri, servicii de orientare profesională și de asistență pentru ocuparea forței de muncă accesibile și actualizate, oferind informații, orientări și sprijin pentru dezvoltarea carierei atât în cadrul instituției în cauză, cât și în afara acesteia. Aceste servicii ar trebui să fie oferite cercetătorilor aflați în toate etapele carierei lor, indiferent de situația lor contractuală.

3. Dezvoltare profesională continuă

În toate etapele carierei lor, cercetătorii ar trebui să încerce în mod proactiv să își îmbunătățească în permanență nivelul prin actualizarea și extinderea periodică a competențelor și aptitudinilor lor, iar angajatorul/finanțatorul lor ar trebui să le ofere oportunități în acest sens. Acest lucru poate fi realizat printr-o varietate de mijloace, printre care se numără, dar nu în mod limitativ, formarea formală, atelierele, conferințele, învățarea online sau colaborarea în cadrul unei echipe și a rețelelor aferente. O atenție deosebită ar trebui acordată formării cercetătorilor debutanți (R1), majoritatea acestora fiind doctoranzi aflați la începutul carierei în cercetare.

Accesul la formare și dezvoltare profesională continuă în domeniul cercetării

Angajatorii și finanțatorii ar trebui să se asigure că tuturor cercetătorilor, indiferent de etapa carierei în care se află și de situația contractuală, li se oferă oportunități de dezvoltare profesională și de îmbunătățire a capacității de inserție profesională, prin acces la măsuri care vizează dezvoltarea continuă a competențelor și aptitudinilor. Angajatorii și finanțatorii ar trebui să ia măsuri pentru a sprijini elaborarea și furnizarea de cursuri de formare specifică, pentru a încuraja crearea de oportunități de perfecționare și recalificare pentru cercetători pe modelul învățării pe tot parcursul vieții și pentru a promova mobilitatea intersectorială și interdisciplinară. Astfel de măsuri ar trebui evaluate periodic din punctul de vedere al accesibilității, al utilizării și al eficacității în ceea ce privește îmbunătățirea aptitudinilor, a competențelor și a capacității de inserție profesională.

Angajatorii și finanțatorii ar trebui să acorde atenția cuvenită necesității de a promova competențe antreprenoriale în rândul cercetătorilor, cu scopul de a le permite celor care urmează un parcurs antreprenorial să își coreleze capacitățile în materie de producere a cunoștințelor cu competențele în materie de valorificare a cunoștințelor, astfel încât să transforme ideile inovatoare în afaceri și să stimuleze inovarea și progresul.

Angajatorii și finanțatorii ar trebui să ia măsuri pentru a asigura compatibilitatea formării doctorale cu carierele interoperabile în toate sectoarele relevante și cu practica științei deschise, inclusiv prin utilizarea Cadrului european al competențelor pentru cercetători (ResearchComp), a principiilor formării doctorale inovatoare, a Codului de conduită european pentru integritatea în cercetare și a oricăror alte inițiative viitoare întreprinse cu scopul de a consolida competențele transversale ale cercetătorilor.

Validarea competențelor

Ca parte a procesului de extindere a setului de competențe ale cercetătorilor, angajatorii și finanțatorii ar trebui să prevadă o evaluare corespunzătoare a formării formale și informale, inclusiv a competențelor și formării la locul de muncă, în special în contextul mobilității internaționale, intersectoriale și interdisciplinare. Evaluarea ar trebui să fie realizată într-un mod echitabil și transparent și într-un interval de timp rezonabil.

Activitatea didactică

Activitatea didactică este un mijloc esențial de structurare și diseminare a cunoștințelor și reprezintă o opțiune utilă în cadrul parcursului profesional al unui cercetător. Activitatea didactică ar trebui să beneficieze de cunoștințe științifice, să utilizeze aceste cunoștințe și să promoveze interesul pentru cercetare în rândul studenților. Implicarea cercetătorilor în activitatea didactică ar trebui să fie pe deplin sprijinită și recunoscută și poate varia în diferite momente ale carierei. Ar trebui să se acorde o atenție deosebită cercetătorilor aflați la începutul carierei, pentru a se asigura că aceștia sunt sprijiniți în mod corect și că responsabilitățile didactice – inclusiv predarea, tutoratul, supravegherea și mentoratul – sunt compatibile cu activitățile de cercetare pe care le desfășoară sau cu activitățile de formare în domeniul cercetării.

Angajatorii și finanțatorii ar trebui să se asigure că atribuțiile didactice sunt remunerate în mod corespunzător și sunt luate în considerare în cadrul sistemelor de evaluare/apreciere încă dintr-o etapă timpurie a carierei cercetătorilor. De asemenea, ar trebui să se asigure că timpul alocat de personalul cu calificări superioare pentru activități de formare și mentorat destinate cercetătorilor aflați la început de carieră – R1, R2 – este contorizat drept parte a angajamentului didactic al acestora. Ar trebui să se ofere formare adecvată pentru activitățile didactice și de mentorat ca parte a procesului de formare inițială și de dezvoltare profesională a cercetătorilor.

4. Supraveghere și mentorat

Gestionarea adecvată a personalului și a echipelor este crucială în mediile de lucru din domeniul cercetării, întrucât știința, prin definiție, este un efort comun. Ar trebui instituite activitățile de formare, instrumentele și mecanismele de evaluare necesare pentru a se asigura că cercetătorii cu calificări superioare și cercetătorii principali își gestionează personalul și echipele într-un mod echitabil și nediscriminatoriu, fără prejudecăți de gen sau de altă natură – cum ar fi prejudecățile bazate pe religie, orientarea sexuală, rasă, etnie, mediul socioeconomic etc. –, și stabilesc relații profesionale productive și bazate pe cooperare cu omologii lor. Acest lucru ar trebui să contribuie la crearea unor medii sănătoase, echitabile și creative, în care fiecare persoană este respectată, motivată în mod corespunzător și recunoscută, promovându-se starea de bine a acesteia.

Angajatorii și finanțatorii ar trebui să se asigure că este desemnată o persoană sau un grup de persoane căreia/căruia i se pot adresa cercetătorii debutanți (R1) și cercetătorii recunoscuți (R2) pentru chestiuni legate de îndeplinirea sarcinilor lor și să îi informeze pe cercetători în consecință.

Astfel de formule ar trebui să stipuleze în mod clar că supraveghetorul propus deține un nivel adecvat de expertiză în materie de supraveghere a cercetării, că dispune de timpul necesar și că s-a angajat în mod corespunzător să ofere stagiarului în cercetare sprijinul adecvat; în plus, ele ar trebui să asigure procedurile necesare în materie de progres și evaluare, precum și mecanismele de feedback necesare.

În Orientările privind supravegherea ale MSCA se regăsesc dispoziții specifice privind integrarea, sprijinul pentru cercetare și dezvoltarea carierei cercetătorilor, mentoratul și starea de bine a acestora, soluționarea conflictelor și comunicarea, precum și dispoziții privind formarea și dezvoltarea profesională a supraveghetorilor. Orientările privind supravegherea ale MSCA reprezintă un set de recomandări pentru persoane și instituții care beneficiază de finanțare prin MSCA. Orientările promovează supravegherea și mentoratul eficace, precum și măsuri adecvate de orientare profesională.

Relațiile cu supraveghetorii

Cercetătorii aflați în etapa de formare ar trebui să stabilească o relație structurată și periodică cu supraveghetorul (supraveghetorii) lor și cu reprezentantul (reprezentanții) facultății/departamentului, astfel încât să beneficieze din plin de această relație. Supraveghetorii ar trebui, de asemenea, să sprijine în mod activ în special cercetătorii aflați la început de carieră prin organizarea de reuniuni de feedback cu aceștia și prin promovarea de activități de formare relevante pentru activitatea acestora.

Acest lucru presupune, printre altele, ținerea unei evidențe a progreselor realizate și a rezultatelor cercetării, obținerea de feedback prin intermediul rapoartelor și a seminarelor, utilizarea acestui feedback și desfășurarea activității în conformitate cu programele, obiectivele intermediare, livrabilele și/sau rezultatele cercetării asupra cărora s-a convenit.

Cercetători cu calificări superioare

Cercetătorii cu calificări superioare – R3 și R4 – ar trebui să acorde o atenție deosebită rolului lor multiplu de supraveghetor, mentor, consilier de carieră, șef, coordonator de proiect, manager sau comunicator științific. Aceștia ar trebui să își îndeplinească îndatoririle la cele mai înalte standarde profesionale și să aibă acces la o formare corespunzătoare. În ceea ce privește rolul de supraveghetor sau mentor, cercetătorii cu calificări superioare ar trebui să stabilească o relație constructivă și pozitivă cu cercetătorii debutanți (R1) și recunoscuți (R2), astfel încât să creeze condițiile unui transfer eficient de cunoștințe și să permită o evoluție de succes a carierelor acestora. Sprijinirea dezvoltării carierei cercetătorilor R1 și R2 prin comunicarea de experiențe și de valori într-un mediu caracterizat de încredere și confidențialitate constituie un rol de mare responsabilitate.

Official Journal
of the European Union

EN
C series

C/2023/1640

29.12.2023

COUNCIL RECOMMENDATION

of 18 December 2023

on a European framework to attract and retain research, innovation and entrepreneurial talents in Europe

(C/2023/1640)

THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION,

Having regard to the Treaty on the Functioning of the European Union, and in particular Article 182(5) and Article 292, first and second sentence, thereof,

Having regard to the proposal from the European Commission,

Whereas:

(1) Commission Recommendation 2005/251/EC ([1]) played an important role in supporting researchers and research careers in the Union. The European Charter for Researchers and the Code of Conduct for the Recruitment of Researchers ('Charter and Code for Researchers') have become reference points for researchers and employers or funders of researchers, contributing to strengthening the European Research Area (ERA) and supporting the development of a more attractive, open and sustainable Union labour market for researchers. A European procedure certifying the commitment and progress of an institution towards the implementation of the principles of the Charter and Code for Researchers, the Human Resources Strategy for Researchers (HRS4R), is in place since 2008.

(2) The Commission Communication entitled 'European Skills Agenda for sustainable competitiveness, social fairness and resilience', adopted on 1 July 2020 ([2]), underlines that researchers are at the forefront of science and innovation, and that they need specific sets of skills to have successful careers within and outside academia. It foresees the definition of a taxonomy of skills for researchers to allow, inter alia, the statistical monitoring of brain circulation, the development of a European Competence Framework for Researchers, and support for equipping researchers with the skills needed for inter-sectoral mobility. The first flagship action of the Skills Agenda, the Union Pact for Skills, supports upskilling and reskilling through collaboration between industry, education and training providers, social partners and public authorities in largescale skills partnerships.

(3) The Commission Communication entitled 'A New ERA for Research and Innovation', adopted on 30 September 2020 ([3]), acknowledges that career development conditions to attract and retain the best researchers in the Union are necessary in the global race for talents, and that precarious employment, notably for early-career researchers, has not been adequately addressed over the past years. It also highlights the frequent misalignment between researchers' skills and the needs of society and the economy, and the importance to train and incentivise researchers to pursue a career outside academia, involving industry. That Communication points out that in order to strengthen research careers in Europe, there is a need for a toolbox of measures aiming at the recognition of researchers' skills, the development of a competence framework for researchers, enhanced mobility and exchange mechanisms between academia and industry, targeted training opportunities, and a one-stop-shop portal that researchers from the public and private sectors can all access for a wide range of support services. That Communication also foresees the improvement of the research assessment system to rightfully and properly recognise diversity of career paths and activities that better respond to the requirements of society.

([1]) Commission Recommendation 2005/251/EC of 11 March 2005 on the European Charter for Researchers and on a Code of Conduct for the Recruitment of Researchers (OJ L 75, 22.3.2005, p. 67).

([2]) Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions 'European Skills Agenda for sustainable competitiveness, social fairness and resilience', COM(2020) 274 final.

([3]) Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions 'A new ERA for Research and Innovation', COM(2020) 628 final.

(4) The Council Conclusions on the 'New European Research Area' of 1 December 2020 stress that creating attractive and safe working conditions, and enhancing the attractiveness of research careers, taking into account open science, gender equality, digital skills, research assessment, diversification of research careers and multiple career paths, are vital elements of the new ERA, contributing to attracting and retaining excellent researchers.

(5) The Council Conclusions on 'Deepening the European Research Area: Providing researchers with attractive and sustainable careers and working conditions and making brain circulation a reality' of 28 May 2021 recognise that researchers are at the heart of Union research and innovation systems, and that more coordinated action at Union level is needed to overcome the existing challenges faced by researchers in building interoperable and sustainable research careers – allowing for diversified and multiple career paths –, stimulating balanced talent circulation, and making the Union an attractive destination for researchers. Those conclusions suggest that an analysis of the possible evolution of the Charter and Code for Researchers towards a single and comprehensive framework, which addresses all challenges related to research careers beyond values and principles and focuses on all possible research employment domains, be carried out and request that the Commission make a proposal in 2022. Matters such as recruitment, incentives for early-career researchers, career diversification and progression, interoperability with all sectors of society including industry, researchers' assessment, gender equality, work-life balance, and an improved governance and services of EURAXESS and other instruments like Europass are suggested as elements to be included in that proposal.

(6) Council Recommendation (EU) 2021/2122 on 'a Pact for Research and Innovation in Europe' ([4]) includes research careers and the mobility of researchers, together with assessment of research, researchers and institutions, as important fields of action in the context of the priority areas for joint action by the Union and Member States in support of the ERA, and specifies a common set of principles and values to underpin research and innovation in the Union. It also highlights the need to give greater attention to early- and mid-stage researchers' careers, including the specific barriers that women face in those stages.

(7) The ERA Policy Agenda annexed to the Council Conclusions on the 'Future governance of the European Research Area' of 26 November 2021 includes dedicated actions to 'Advance towards the reform of the assessment system for research, researchers and institutions to improve their quality, performance and impact', and to 'Promote attractive and sustainable research careers, balanced talent circulation and international, transdisciplinary and inter-sectoral mobility across the ERA'. The last-mentioned action foresees the development of a Union framework for research careers, together with the upgrading of existing instruments and initiatives and creation of new ones. That includes the launch of an observatory on research careers; an evolution of the Charter and Code for Researchers; the setup of the ERA Talent Platform as a one-stop-shop online gateway to EURAXESS services, network and portals including HRS4R, and RESAVER; the launch of the ERA4You initiative to promote talent circulation between sectors and across the Union; the exchange of good practices with regard to research and innovation systems to support balanced brain circulation; and the piloting of the new framework for research careers with the European Universities alliances.

(8) The Commission Communication entitled 'A European Strategy for Universities', adopted on 18 January 2022 ([5]), envisages the development of a framework for research careers, in synergy with a European framework for attractive and sustainable careers in higher education to be proposed by 2023.

(9) The Commission Communication entitled 'A new European Innovation Agenda', adopted on 5 July 2022 ([6]), acknowledges that innovation depends on successfully attracting, nurturing and retaining talented individuals and a diverse array of skills and underlines the importance of inter-sectoral mobility.

([4]) Council Recommendation (EU) 2021/2122 of 26 November 2021 on a Pact for Research and Innovation in Europe (OJ L 431, 2.12.2021, p. 1).

([5]) Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions on a European strategy for universities, COM(2022) 16 final.

([6]) Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions – A New European Innovation Agenda, COM(2022) 332 final.

(10) Council Recommendation (EU) 2022/2415 on the guiding principles for knowledge valorisation ([7]) emphasises the importance of investing in the development of entrepreneurial culture, practices, skills and capacities for researchers and other research and innovation actors, including intermediaries, whose continuing professional development is essential to maximising the transformation of research and innovation results into solutions that benefit society. A Code of Practice on industry-academia collaboration will support the implementation of that Recommendation.

(11) The Council Conclusions on the European Universities initiative – Bridging higher education, research, innovation and society: Paving the way for a new dimension in European higher education ([8]) invite Member States and the Commission to promote synergies between the higher education dimension of the European Education Area (EEA), the ERA and the European Higher Education Area (EHEA).

(12) Researchers are a fundamental resource for society. They conduct research, foster innovation, contribute to solutions to societal challenges and provide policymakers with evidence for informed decision-making processes. Researchers are highly skilled talents who have great potential to better meet labour market demand. It is crucial to improve researchers' overall working conditions and environment, including by offering them attractive salaries.

(13) Enhancing the attractiveness and stability of research careers across the Union is a key element of the ERA. Therefore, there is a clear need to make research careers more attractive and inclusive for students and graduates, and to put in place framework conditions to retain talented researchers in the Union, as well as for making it an appealing and competitive destination for international researchers.

(14) The Marie Skłodowska-Curie Actions (MSCA) have been supporting for over 25 years, as part of the Framework Programmes for Research and Innovation, researchers from all over the world, at all stages of their careers, with a focus on training, skills and career development. The programme has also had a structuring impact on organisations –higher education institutions, research organisations, enterprises etc. – by spreading good practices and increasing their international attractiveness and visibility, in particular through the development of excellent doctoral programmes. The MSCA contributes to inter-sectoral, inter-disciplinary and geographical mobility, develops researchers' skills, addresses gender imbalances, retains talented researchers and attracts new talent to Europe. In particular, the MSCA Industrial Doctorate scheme can be considered an example of best practice, where the research experience, location and supervision of a doctoral candidate are equally shared between an academic and a non-academic establishment with provisions to ensure academic standards. It is an important example of interaction and cooperation between ecosystem actors, fostering transversal skills and inter-sectoral mobility, and supporting industry's need for highly skilled talents and researchers' understanding of industrial challenges, aiming at greater recruitment opportunities within the ecosystem.

(15) Eurostat data show a growing trend in the number of full-time equivalent researchers in the Union. In 2021, there were 2 million researchers working in the Member States, which is 627 000 more than in 2011. Most researchers work in the business enterprise sector (56 %) and the higher education sector (32 %), followed by the public sector (11 %). It is important to sustain this growth with adequate investment, infrastructure and policies at national and Union level that support attractive research careers, including with regard to diversity, inclusiveness and gender equality, and that promote a culture valuing research careers in all sectors of society.

(16) There is a need for a clear and common definition and understanding of 'researcher' at Union level, for example the widely accepted definition from the Frascati Manual. Researchers should be understood as professionals performing research and innovation activities in all sectors, including academia – higher education institutions, research organisations, research infrastructures –, business – including industry, start-ups, spin-offs or small and medium-sized enterprises –, public administration bodies – including government, policy-making bodies, public laboratories and the health care system –, and the non-profit sector. Researchers may be additionally involved in different types of activities in any sector of the economy or society. Efforts are needed to achieve full recognition of researchers' careers, as well as to improve the comparability across Member States and sectors.

([7]) Council Recommendation (EU) 2022/2415 of 2 December 2022 on the guiding principles for knowledge valorisation (OJ L 317, 9.12.2022, p. 141).

([8]) Council conclusions on the European Universities initiative – Bridging higher education, research, innovation and society: Paving the way for a new dimension in European higher education (OJ C 221, 10.6.2021, p. 14).

(17) Performing high-level research and innovation requires the support of other professionals. Amongst them, research management and research technician careers deserve proper recognition, including by way of further analysis and alignment at the level of the Union. Research management capacity should be strengthened by defining required skills and competences, developing relevant training, fostering comparability, and allowing their holders to effectively manage and support research and innovation.

(18) The European Skills, Competences, Qualifications and Occupations (ESCO) classification has been updated in 2022 to include improved taxonomies of skills and occupations for researchers, thus specifying the occupations relevant for researchers across labour market sectors, and the transversal skills researchers need. The implementation of the ESCO classification in EUROPASS and in the European network of employment services (EURES) facilitates the uptake of that improved taxonomy in the labour market. The Commission needs to interact with the International Labour Organization to ensure the specific category of 'researcher' is included in future revisions of the International Standard Classification of Occupations (ISCO), on which the ESCO classification is based.

(19) As recognised by Article 13 of the Charter of Fundamental Rights of the European Union, and as stated in the Bonn Declaration on Freedom of Scientific Research of 20 October 2020, the European Higher Education Area Rome Communiqué of 19 November 2020, and Council Recommendation (EU) 2021/2122, academic freedom and freedom of scientific research must be safeguarded as essential prerequisites for researchers to advance research and innovation. A Staff Working Document on tackling research and innovation – R&I – foreign interference was published by the Commission in January 2022, outlining best practices to support higher education institutions and research organisations in safeguarding their fundamental values, including academic freedom, integrity and institutional autonomy, as well as to protect their staff, students, research findings and assets.

(20) There is a need to effectively address persisting gender inequalities – including the gender pay gap, gender biases in assessment and recognition, work-life balance issues as well as gender-based violence – in addition to possible intersections of gender with other conditions of vulnerability or marginalisation such as ethnicity, disability and sexual orientation in research careers, as they all affect participation and career progression. Instruments of institutional change, such as inclusive gender equality plans, can be important in this regard, taking note of the Gender Equality Strategy 2020-2025 ([9]). SHE FIGURES 2021 showed that women continue to be under-represented among researchers, constituting only 33 % of the total population of researchers in the Union. Additionally, that report also demonstrated that a higher percentage of researchers who are women are employed in the higher education sector, compared to researchers who are men, whereas their percentages are lower in the public and business sectors. Across the Union, a higher proportion of researchers who are women, compared to researchers who are men, work on a part-time basis and under precarious contracts in higher education – 11 % in the case of women and 7 % in the case of men – and women only occupy 26 % of the top academic positions, those of full professorship or equivalent researcher positions. Therefore, specific efforts are needed to address gender inequalities in research careers and women's under-representation in the science, technology, engineering and mathematics fields in research and innovation, as well as in the higher education sector as highlighted in the European Strategy for Universities.

(21) To support the full personal and professional development of researchers in the Union, and in particular of early-career researchers, it is essential to address existing challenges which have negative consequences on the overall research and innovation system in the Union, and on the internal market for research. Such challenges include aspects of employment and working conditions, such as differing student or employee status for doctoral candidates across the Member States, a frequent lack of open, transparent and merit-based recruitment, precarity linked to short-term project-based contracts, unsatisfactory access to equal opportunities, a lack of inter-sectoral mobility opportunities during doctoral training and postdoctoral work, a lack of work-life balance, family care, physical and mental health wellbeing measures, and weaknesses in social protection tools, including difficulties with the portability of entitlements between sectors and Member States.

([9]) Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions – A Union for Equality: Gender Equality Strategy 2020-2025, COM(2020) 152 final.

(22) The employability and career development of early-career researchers would benefit from dedicated incentives for their recruitment, such as financial and social protection incentives, including opportunities for permanent or open-ended contracts in line with Council Directive 1999/70/EC of 28 June 1999 ([10]). In this respect, a wider use of baseline funding or life-cycle research funding could be promoted alongside project-based funding. Baseline funding provides higher education institutions or research organisations with a projection of guaranteed financial support in return for meeting certain deliverables and quality standards; life-cycle funding is characterised by an initial competition for funding that is renewed if assessed positively following a monitoring process. This allows research organisations to develop more long-term research strategies and engage in sustainable commitments towards employees, while using project-based funding to continue exploring new itineraries.

(23) As asserted in Article 22 of the Universal Declaration of Human Rights, one has, as a member of society, the right to social security and an entitlement to the realisation of the economic, social and cultural rights indispensable for one's dignity and the free development of one's personality. Principle 15 of the European Pillar of Social Rights states that, in retirement, both the employed and the self-employed have the right to a pension commensurate to their contributions that ensures an adequate income. Yet, mobile researchers experience difficulties accumulating adequate supplementary pensions as a result of vesting periods, high transfer fees, limited knowledge of complex financial products and administrative burdens on retirement. Therefore, safeguards based on the Council Recommendation of 8 November 2019 on 'Access to social protection for workers and the self-employed' ([11]) should be ensured for researchers.

(24) RESAVER, the European pension solution supported by the Commission which deals with occupational retirement provisions for research performing organisations and which will be one of the components of the upcoming ERA Talent Platform, has the potential to address the social protection issues faced by mobile researchers. However, its uptake is hindered by limited awareness and substantial administrative and legal hurdles. With the aim of safeguarding the occupational pension rights of mobile researchers, information about how potential mobility might affect pension rights should be provided and the participation of research performing organisations in RESAVER should be considered.

(25) Inter-sectoral, inter-disciplinary and geographically balanced mobility are essential to making research careers in the Union more effective, sustainable and attractive. With such mobility, the overall research and innovation system becomes more competitive, and fosters better knowledge production, circulation, and use, while promoting and enabling non-linear, diversified career paths. Those forms of mobility, including virtual mobility, should be promoted, incentivised and adequately integrated into researchers' professional development and action should be taken to address existing mobility obstacles of any nature, including the limited portability of grants, the administrative burden, for example, of business trips, or for the recognition of residence permits for mobile researchers, relocation challenges, or language barriers, or for the transfer of pension entitlements.

(26) A change of approach is needed to foster interoperable and inter-sectoral research careers, whereby the assessment and reward system would attribute equal value to careers undertaken in all sectors and would not penalise geographical, inter-disciplinary and inter-sectoral mobility, career breaks or career relocation, including sabbaticals or parental leave, and researchers would take into consideration indistinctly careers in academia and beyond. Multiple career paths, characterised by geographical, sectoral, and inter-organisational mobility, or hybrid paths, characterised by the simultaneous combination of sectors, deserve full recognition and consideration on a par with linear career paths – to be understood as careers following a straight line of progression from one position to another, usually within the same field or discipline.

([10]) Council Directive 1999/70/EC of 28 June 1999 concerning the framework agreement on fixed-term work concluded by ETUC, UNICE and CEEP (OJ L 175, 10.7.1999, p. 43).

([11]) Council Recommendation of 8 November 2019 on access to social protection for workers and the self-employed (2019/C 387/01) (OJ C 387, 15.11.2019, p. 1).

(27) In some instances, doctoral training continues to be directed primarily at future careers in academia, and does not sufficiently take into consideration the wider range of occupations across relevant sectors, or the importance of fostering entrepreneurship among researchers. Equipping researchers with transversal skills through formal and informal trainings, in addition to strong research skills, is highly important for creating better career opportunities, inter-sectoral mobility and innovation, and for making research careers in the Union more attractive.

(28) The European Competence Framework for Researchers (ResearchComp) developed by the Commission in consultation with Member States and stakeholders, will play an important role in equipping researchers with a wide set of transversal skills and closing the skills gap between academia and all other relevant sectors. Researchers' training – including doctoral training – could be developed according to the competences described in the framework and based on the exchange of best practices in order to allow for lifelong up-skilling and re-skilling of researchers. Adequate recognition of, and validation mechanisms for, formal and informal training opportunities, including on-the-job training, would be needed.

(29) To ensure that researcher training is developed or co-developed on the basis of actual skills needs, the interaction and cooperation of academia, industry, business, public administration, the non-profit sector, and all other relevant ecosystem actors could be promoted, including for example in relation to internships, traineeships or job shadowing. The Principles for innovative doctoral training included in the Report adopted by the ERA Steering Group on Human Resources and Mobility of 2011, as well as Council Recommendation (EU) 2022/2415 of 2 December 2022 on the Guiding principles for knowledge valorisation ([12]) which points out the need to have a system conducive to entrepreneurial activities for the benefit of researchers, could be taken into consideration in this regard.

(30) Fostering an entrepreneurial mindset and related competences among researchers, including competences for seeking investors and capital, is crucial to improve knowledge valorisation and the transformation of innovative ideas into new services and products with higher potential for market uptake, sustainable growth, innovation and societal benefits. Following a successful entrepreneurial path requires that intellectual assets such as publications, data, know-how and intellectual property are properly understood and efficiently managed as set out in Council Recommendation (EU) 2022/2415 of 2 December 2022 on the Guiding principles for knowledge valorisation ([12]).

(31) Cross-sectoral talent circulation and improved interoperability of research and innovation jobs among sectors demand a combination of different and complementary measures at national and Union levels in accordance with the principles of academic freedom and institutional autonomy, including system reform. A policy approach that involves mutual learning on the basis of successful models for inter-sectoral mobility schemes can contribute to strengthening a mutually beneficial academia/non-academia cooperation, and reinforcing innovation ecosystems, improving training and lifelong learning for researchers, innovators, and other research and innovation talents, including up-skilling to build support capacity, and enhancing the recruitment system, and boosting researchers' development of entrepreneurial skills.

(32) Researchers are not always aware of the crucial role of policy making in the field of research and innovation and the role of science in policy making. Both dimensions can have an impact on the research careers overall as well as on the research and innovation system. It is important for doctoral training to include and instil this awareness, in order to ensure greater involvement of researchers in the policy making process and recognise their activities in science for policy throughout their career.

(33) Researchers, in particular early-career ones, should be made aware of opportunities available in all sectors and of the possibility of pursuing those opportunities to widen their personal and professional development spectrum. Career advisory and support services, tailored to the needs of researchers, have an important role to play by stimulating inter-sectoral, inter-disciplinary, geographical and virtual mobility, and through the possibility of developing entrepreneurial activities. Interinstitutional mobility, notably between different profiles of higher education

([12]) Council Recommendation (EU) 2022/2415 of 2 December 2022 on the guiding principles for knowledge valorisation (OJ L 317, 9.12.2022, p. 141).

institutions and research organisations and along diverse and flexible academic paths should be promoted, including by addressing obstacles linked to the competences developed in the previous institution, and the ones required in the new one.

(34) Research assessment should enable evaluating the performance of researchers and research to achieve the highest quality and impact. As highlighted in the 2022 Paris call on research assessment, in the scoping report 'Towards a reform of the research assessment system' published by the Commission in 2021 and based on a broad consultation with stakeholders, in the Council Conclusions on 'Research assessment and implementation of Open Science' of 10 June 2022, and in the Agreement on Reforming Research Assessment published in July 2022, a proper evaluation of performance requires a recognition of increasingly diverse research outputs, activities and practices, including collaboration and open sharing of outputs, and ensuring high research integrity standards and societal impact of research. Researcher assessment should therefore move to a more balanced approach between the quantitative and qualitative evaluation of research, by favouring qualitative assessment with peer-review, supported by responsible use of quantitative indicators.

(35) In order to reinforce careers in academia leading to the most senior positions, a transparent, structured, inclusive and gender-equal career accession and progression system is needed. The development of tenure-track-like systems, to be understood as defined frameworks where a fixed-term contract has the prospect of progression to a permanent position subject to positive evaluation, could be considered for this purpose at the level of Member States and research performing organisations.

(36) Despite efforts at Union, national and regional level, the issue of talent drain from less developed regions in the Union persists, as highlighted in the Commission Communication entitled 'Harnessing talent in Europe's regions' ([13]), and additional measures are required to achieve more balanced geographical mobility for researchers. The Commission talent circulation analyses 2021-2022 indicate the positive contribution of existing actions at Union level to encouraging more balanced talent circulation, but they also identify persistent challenges and provide pathways for brain gain. Excellent research environments – including research infrastructures –, attractive working conditions and a level of remuneration commensurate with professional qualifications and the activities performed, play a very important role in this context, but they often require reforms of the national research and innovation systems. A policy approach that aims to support and incentivise such system transformations should be pursued, involving mutual learning exercises on the basis of successful pathways that have enabled establishing a more balanced circulation of talents in Member States.

(37) Supporting researcher mobility and career development, while ensuring a sustainable talent pipeline for the research and innovation domain and enhancing scientific collaboration between the Union and the world, is the main objective of EURAXESS, a unique pan-European initiative delivering information and support services free of charge to researchers and their families. To further support this objective, EURAXESS could expand its information delivery and support activities for researchers and higher education institutions and research organisations, with optimised structure of services and governance, improved digital and user experience and interoperability with other Union initiatives such as Europass and EURES. The effectiveness and coherence of EURAXESS information portals and services would benefit from strong national bridgehead organisations.

(38) To remain globally competitive, the Union needs to become more attractive for talent from around the world while avoiding talent drain affecting developing countries. The Commission Communication entitled 'Attracting skills and talent to the EU', adopted on 27 April 2022 ([14]), emphasises the necessity for the Union to enhance its appeal to global talent, notably by promoting innovation and entrepreneurship in the Union and by exploring further potential avenues for legal migration to the Union in the medium to longer term. The revision of Directive (EU) 2021/1883 of the European Parliament and of the Council ([15]) was an important step to improve the Union's attractiveness allowing highly qualified migrants to benefit from improved rights as well as quicker and more

([13]) Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions 'Harnessing talent in Europe's regions', 17 January 2023, COM(2023) 32 final.

([14]) Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions 'Attracting skills and talent to the EU', COM(2022) 657 final.

([15]) Directive (EU) 2021/1883 of the European Parliament and of the Council of 20 October 2021 on the conditions of entry and residence of third-country nationals for the purpose of highly qualified employment, and repealing Council Directive 2009/50/EC (OJ L 382, 28.10.2021, p. 1).

streamlined procedures. Directive (EU) 2016/801 of the European Parliament and of the Council ([16]) also contributes to those objectives by making it easier and more attractive for students and researchers to come to the Union while at the same time promoting the circulation of knowledge and skills through enhanced intra-Union mobility rights.

(39) The Charter and Code for Researchers is being revised to respond to the new reality and the current challenges faced by researchers and institutions, including a better integration of gender balance, gender equality and inclusiveness comprising measures aiming at research environments that are free from gender-based violence, as well as open science practices. The new Charter for Researchers, in Annex II of this Recommendation, is streamlined in order to simplify its implementation and to promote its uptake beyond the academic sector. All organisations employing or providing funding for researchers are invited to endorse the new Charter for Researchers. Organisations that have endorsed the principles of the existing Charter and Code for Researchers are considered as continuing to endorse the new Charter for Researchers. This should apply in particular to institutions that have entered or completed the HRS4R process, for which the endorsement of the Charter for Researchers constitutes the first step.

(40) An observatory on research careers, combining the best of the current Union data in a single place, is needed to monitor the implementation of measures to strengthen research careers and system reforms. It should support the data needs of Member States and research performing organisations relevant for the adaptation and development of policies for research careers. It should equally support researchers to have a better understanding of challenges and opportunities, and promote the attractiveness of Europe's research performing organisations for the best talents. Where relevant, links with the European Higher Education Sector Observatory proposed in the European Strategy for Universities could be considered. Data collected in application of Regulation (EU) 2019/1700 of the European Parliament and of the Council ([17]) could be adapted to respond to the needs of the research careers observatory's users.

(41) In order for the European framework to attract and retain research, innovation and entrepreneurial talent in the Union to succeed, commitments from the Member States and all stakeholders involved are needed. In particular, alliances of higher education institutions, such as those established under the European Universities Initiative and supported by the Erasmus+ Programme and the Framework Programmes for Research and Innovation, as well as the wider higher education sector, research organisations and all relevant stakeholders, could be encouraged to participate on a voluntary basis and following a bottom-up approach, to contribute to a broad implementation of the framework by piloting relevant activities.

(42) Those recommendations should be implemented with due regard to the broad diversity of national research and innovation systems and circumstances and to the principle of institutional autonomy of higher education institutions and research organisations across the Union,

HAS ADOPTED THIS RECOMMENDATION:

Researchers, research managers and research technicians in the European Research Area

1. For the purposes of this Recommendation:

'Researchers' means professionals engaged in the conception or creation of new scientific knowledge based on original concepts or hypotheses. They conduct research and improve or develop concepts, theories, models, infrastructures, techniques, instrumentation, software or operational methods. Researchers may be involved fully or partially in different types of activities – such as basic or applied research, experimental development, operating research

([16]) Directive (EU) 2016/801 of the European Parliament and of the Council of 11 May 2016 on the conditions of entry and residence of third-country nationals for the purposes of research, studies, training, voluntary service, pupil exchange schemes or educational projects and au pairing (OJ L 132, 21.5.2016, p. 21).

([17]) Regulation (EU) 2019/1700 of the European Parliament and of the Council of 10 October 2019 establishing a common framework for European statistics relating to persons and households, based on data at individual level collected from samples, amending Regulations (EC) No 808/2004, (EC) No 452/2008 and (EC) No 1338/2008 of the European Parliament and of the Council, and repealing Regulation (EC) No 1177/2003 of the European Parliament and of the Council and Council Regulation (EC) No 577/98 (OJ L 261I, 14.10.2019, p. 1).

equipment in any sector of the economy or society and disseminating and valorising research results. They may also be partially involved in, among others, project management, teaching, mentoring, supporting evidence-informed policy making, open science practices, knowledge and technological transfer activities, and science communication. Researchers identify options for new research and development activities, and plan for and manage them by using high-level skills and knowledge developed through formal education and training or from experience.

2. Researchers can conduct their activities with equal relevance in all sectors performing research and innovation, including academia, industry, business, public administration and the non-profit sector, where their skills, knowledge and attitudes can be beneficial to European society, the research and innovation system, and the economy.

3. Research management careers can be undertaken by researchers and other professionals to manage and support research and innovation activities. Research management careers should be adequately framed and recognised at the level of the Union, by defining relevant skills and competences, in order to strengthen research managers' professional capacity, to enable the development of relevant training, and to foster comparability. Research managers can perform different tasks, for example:

   (a) streamlining or facilitating the planning, development, management, FAIR data management, administration, monitoring, communication and valorisation of research and innovation;

   (b) ensuring compliance with policy objectives, funding programme requirements, financial rules and legal regulations;

   (c) improving the efficiency and effectiveness of research and innovation projects or systems;

   (d) enhancing the impact of research and innovation on policy and society;

   (e) supporting the design and implementation of research and innovation policies, programmes and projects.

4. Research technicians are professionals whose main tasks require high levels of technical knowledge, training, and experience in one or more fields of engineering, the physical and life sciences, or the social sciences and humanities. They participate in scientific and technical tasks involving the application of concepts and operational methods and the use of research equipment, normally under the supervision of researchers. Research technicians have a crucial support role in the performance of high-level research and innovation. Member States should consider adequately framing and recognising research technicians' careers at national level.

5. All researchers, regardless of their status and sector of employment, should be framed in the following profiles:

   (a) R1 – First Stage Researcher: Researchers doing research under supervision up to the point of a PhD or equivalent level of competence and experience.

   (b) R2 – Recognised Researcher: Researchers with a PhD or equivalent level of competence and experience who have not yet established a significant level of independence in developing their own research, attracting funding, or leading a research group.

   (c) R3 – Established Researcher: Researchers with a PhD or equivalent level of competence and experience who are able to independently develop their own research, attract funding, and lead a research group.

   (d) R4 – Leading Researcher: Researchers with a PhD or equivalent level of competence and experience who are recognised as leading their research field by their peers.

6. For the purposes of this Recommendation, R1 and R2 profiles should be considered early-career researchers, and R3 and R4 profiles should be considered senior researchers.

   Member States are recommended to encourage the use of references to the profiles in all vacancies specifically addressed to researchers or, where relevant, to invite higher education institutions and research organisations to do so.

   Profiles should not necessarily be considered as stages on a progressive career path.

A non-exhaustive list of examples of occupations for researchers across sectors along the R1-R4 profiles is set out in Annex I.

Recognition, interoperability and comparability of researchers' careers

7. Member States and the Commission are recommended to promote and support a full recognition of researchers' careers as well as an equal esteem and reward of the different paths regardless of the sector of employment or activity, and to take supportive measures to allow for their full interoperability and comparability across Member States, sectors and institutions.

8. Non-linear, multi-career and hybrid paths could be encouraged and supported by Member States, and should be recognised on a par with linear career paths with multiple professional outcomes.

9. Member States are recommended to implement new versions and updates of the European Skills, Competences, Qualifications and Occupations classification, with specific regard to researchers' occupations and skills.

10. Member States are recommended to encourage human resources offices in all sectors to map career structures for researchers against the profiles referred to in point 5 of this Recommendation.

Recruitment and working conditions

11. Member States are recommended to promote and support open, transparent and merit-based selection and recruitment of candidates, without penalisation for career breaks or non-linear, multi-career, and hybrid paths.

12. Member States are recommended to encourage respect of collective agreements and effective social dialogue, and to take support action so that employers and funders provide attractive, inclusive and competitive research and working conditions, where researchers are valued, encouraged and supported. Such support action could include:

(a) providing commensurate remuneration, work-life balance and flexible working conditions that help bring together personal life, family, caring, health, safety, and overall wellbeing, without prejudice to careers;

(b) ensuring gender equality, gender balance, equal opportunities and inclusiveness for researchers from all backgrounds including under-represented and marginalised groups, and promoting among research performing and funding organisations the use, implementation and monitoring of instruments of institutional change, such as inclusive gender equality plans open to intersections between genders and other social categories, in line with the new European Research Area framework and the European Strategy for Universities;

(c) safeguarding the freedom of scientific research from any possible limitation or interference, including from foreign actors;

(d) offering dedicated support at institutional level to researchers in relation to the fulfilment of administrative duties;

(e) taking resolute action to counter the phenomenon of precarity and to support job security and stability. This could, on a voluntary basis, incentivise the establishment of a maximum threshold for the number of fixed-term contracts per organisation in researcher human resources overall. Whenever permanent, long-term or highly recurrent research tasks are being fulfilled, permanent or open-ended contracts are recommended as the appropriate instrument. Researchers under fixed-term contracts should benefit from specific measures – as referred to in point 29 of this Recommendation – that promote their career development and continuity;

(f) considering the use of different funding models – e.g. baseline, life-cycle, or project-based –, to allow research organisations to develop more long-term research strategies and engage in more stable commitments towards employees;

(g) providing access to adequate social protection irrespective of the form of employment, without prejudice to the right of Member States to define the fundamental principles of their social security systems. Such measures could pertain to the following branches, insofar as they are provided in the Member States:

(1) unemployment benefits;

(2) sickness and healthcare benefits;

(3) maternity leave, paternity leave and parental leave and related benefits;

(4) invalidity benefits;

(5) old-age benefits and survivor benefits;

(6) benefits in respect of accidents at work and occupational diseases.

13. Member States are recommended to ensure researchers' access to updated, comprehensive, user-friendly and clearly understandable information on their social protection rights and obligations, and to ensure that entitlements – whether they are acquired through mandatory or voluntary schemes – are preserved, accumulated and/or transferable across all types of employment and self-employment statuses and across borders, economic sectors, throughout the person's working life or during a certain reference period and between different schemes within a given social protection branch.

14. Member States that aim to enhance saving in defined contribution supplementary schemes are recommended to promote the use of the solutions provided by the RESAVER pension fund which guarantees the absence of a vesting period and asset transfer fees.

15. Member States are recommended to encourage specific measures in support of early-career researchers, corresponding to the R1 and R2 profiles referred to in point 5 of this Recommendation. Taking into account national circumstances, such specific measures could include:

(a) providing First Stage Researchers with social protection and working conditions applicable to researchers in other career stages and with adequate income;

(b) providing early-career researchers with financial and social protection incentives;

(c) promoting the use of, and supporting, incentives for the recruitment of early-career researchers by employers in all sectors, in particular with permanent or open-ended contracts;

(d) promoting and recognising interinstitutional, inter-sectoral, inter-disciplinary and geographical mobility, including virtual mobility;

(e) promoting cooperation between academia, research funders and other relevant ecosystem actors, notably industry and other businesses as well as public and non-profit organisations, with regard to skills needed and skills provided, so as to foster recruitment of highly-skilled researchers meeting the targeted skills needed in the sectors concerned;

(f) promoting involvement of early-career researchers into research teams avoiding the demand of tasks unrelated to their scientific training.

Researchers skilled for inter-sectoral and inter-disciplinary careers and for entrepreneurship and innovation

16. The goal of the first-stage researcher is to cultivate the research mindset, to nurture flexibility of thought, creativity, and intellectual autonomy through an original, concrete research project. Member States are recommended to take appropriate steps to encourage that doctoral training is geared towards those goals, and furthermore compatible with interoperable careers in all relevant sectors and for the practice of Open Science, including by making use of ResearchComp, the Principles for Innovative Doctoral Training, the European Code of Conduct for Research Integrity, and of any other future initiatives taken for the purpose of strengthening the transversal skills of researchers.

17. The Commission is recommended to take action to support and facilitate the use of ResearchComp, promote the exchange of good practices, and consider future revisions of the Competence Framework where needed on the basis of the evolution of the research and innovation system and of the labour market.

18. Member States are recommended to place emphasis on schemes aiming to strengthen the transversal skills needed by researchers to engage in knowledge valorisation activities and entrepreneurship. Such schemes could include awareness raising activities and trainings on relevant topics, including intellectual assets management, standardisation, industry-academia, academia-public administration sector collaboration, including science for policy activities, and engagement with society.

19. Member States and the Commission are recommended to encourage interaction and cooperation, including partnerships, between academia, industry, other businesses, public administration, the non-profit sector, and all other relevant ecosystem actors, and to ensure that doctoral training and targeted training are developed or co-developed on the basis of the actual skills needs of the parties concerned, including by building on best practice examples implemented under existing programmes at Union and Member State level.

    The support of such interaction and cooperation is particularly recommended in areas where specific skills are necessary for operating with state-of-the-art research and technology infrastructures.

20. Member States and the Commission are recommended to take action to foster an innovation and entrepreneurial mindset in researchers, including the necessary skills for investment-seeking, with the objective of allowing those who undertake an entrepreneurial career path to couple their knowledge production capabilities with knowledge valorisation proficiency, turning innovative ideas into business and fostering innovation and progress.

    A specific focus should be put on the promotion of entrepreneurship and innovation among women and on the creation of women-led spin-offs. The same approach should be envisaged for minority and marginalised groups.

    Member States could consider measures to mitigate the potential risks for researchers undertaking an entrepreneurial career, including through the possibility to return to their previous career path.

21. Member States are recommended to take action to support the development and provision of targeted training, to encourage up-skilling and re-skilling opportunities for researchers with a lifelong perspective and to foster inter-sectoral and inter-disciplinary mobility. Member States are also recommended to take the necessary steps to promote a fair and transparent validation procedure of formal and informal training opportunities, including on-the-job training.

22. The Commission is recommended to take the following action in the context of the development of initiatives fostering cross-sectoral circulation of talents:

    (a) supporting mutual learning for Member States on the basis of models of inter-sectoral mobility schemes established by the Commission, in three priority areas:

        (1) strengthening academia and non-academia cooperation;

        (2) improving training and lifelong learning for researchers, innovators, and other research and innovation talents;

        (3) boosting entrepreneurship, transversal skills and engagement among researchers in activities increasing social impact;

    (b) reinforcing inter-sectoral mobility components in existing instruments for researchers' mobility, and complementing them with new instruments, where deemed necessary;

    (c) creating awareness on inter-sectoral mobility schemes, via a branch of the ERA Talent Platform referred to in point 33 of this Recommendation.

23. Member States are recommended to consider establishing national schemes promoting inter-sectoral mobility in one or more of the three priority areas referred to in point 22 of this Recommendation.

24. Member States are recommended to undertake all necessary effort to promote the elimination of existing structural and administrative barriers which can hamper or obstruct mobility between sectors, including by supporting researchers in overcoming family and personal barriers to mobility, by supporting the interoperability of careers, where applicable, and by facilitating temporary or permanent mobility, without hindering linear research career paths.

25. Member States and the Commission are recommended to promote inter-disciplinary mobility of researchers, including by adequately taking into consideration and addressing hurdles such as lack of recognition and difficulties in securing funding from traditional sources.

Career assessment, development and progression

26. Member States are recommended to support the recognition of the value of geographical, inter-sectoral, interinstitutional, inter- and trans-disciplinary mobility as important means of enhancement of scientific knowledge and professional development at any stage of a researcher's career. Virtual mobility has been proved as a valid asset and can also be considered. The assessment and reward system should not penalise non-linear, multi-career and hybrid paths.

27. Member States and the Commission are recommended to promote and support systems for the assessment and reward of researchers that:

    (a) are based on qualitative unbiased judgement provided by peers and other pertinent experts, supported by the responsible use of quantitative indicators;

    (b) reward quality and the various potential impacts of their research on society, science and innovation;

    (c) recognise a diversity of outputs, inter alia publications, datasets, software, methodologies, protocols, patents; a diversity of activities, inter alia mentoring, research supervision, leadership roles, entrepreneurship, FAIR data management – following the principles of Findable, Accessible, Interoperable and Reusable –, peer review, teaching, knowledge valorisation, industry-academia cooperation, support for evidence informed policy-making, interaction with society; and a diversity of practices, inter alia Open Science, early knowledge and data sharing, and open collaboration, in addition to all mobility experiences referred to in point 26 of this Recommendation;

    (d) ensure that the researcher's professional activity meets high standards of ethics and integrity, applies appropriate conduct of research, and values good practices, including open practices for sharing research results and methodologies whenever possible;

    (e) use assessment criteria and processes that respect the variety of research disciplines and national contexts;

    (f) support a diversity of researcher profiles and career paths, and value individual contributions, but also the role of teams, collaborative work, and inter-disciplinarity;

    (g) ensure gender equality, gender balance, equal opportunities and inclusiveness.

    To ensure coherence in the implementation of the recommendations listed in this point, Member States are encouraged to foster continuous training for the actors involved in the assessment and reward process.

28. Member States are invited to encourage organisations to join coalitions, alliances or initiatives set up to evolve assessment systems in line with the recommendations listed in point 27 of this Recommendation. Member States are also encouraged to tackle, within their area of competence, national administrative or legal barriers to such evolution of research assessment and help prevent any contradictions or incompatibilities that might exist in the application of the recommendations listed in point 27 of this Recommendation, between the assessment of research, of researchers and of research organisations.

29. Member States are recommended to promote measures, including advisory and mentoring mechanisms, that make researchers, in particular early-career ones, aware of opportunities available in all relevant sectors and to promote a culture of diversification of careers for better personal and professional development. In this regard, Member States and the Commission are recommended to support the provision of career advisory and support services, e.g. EURAXESS, to stimulate inter-sectoral, inter-disciplinary and geographical mobility, as well as the creation and development of entrepreneurial activities.

30. Member States are recommended to promote a fair, equal, inclusive, transparent, structured and gender-equal career accession and progression system for researchers in academia, up to the top positions. In this respect, Member States are recommended to consider developing tenure-track-like systems, to be understood as defined frameworks where a fixed-term contract has the prospect of a progression to a permanent position, subject to positive evaluation.

Balanced circulation of talents and making the Union an attractive destination

31. Member States are recommended to take resolute action to put in place favourable, attractive and competitive conditions for conducting research and innovation activities, and for the return of researchers from abroad. Such measures could include, but not be limited to:

(a) incentives to make research activities more attractive, taking into consideration the need for a fair competition for talents;

(b) simplification of legal and administrative requirements for researchers;

(c) investments in the research and innovation system, including support to networking within and beyond the Union, to connect and integrate national research and innovation systems to European research networks and provide higher visibility of national capabilities and high-level research and technology infrastructures;

(d) the exchange of best practices with regard to creating an attractive, safe, inclusive, gender-equal and competitive research and innovation environment, even as regards the improvement of remuneration, working conditions and services, and the reduction of administrative and language barriers for foreign and internationally mobile researchers;

(e) return and career reintegration grants and attractive positions for returning researchers;

(f) the possibility of having dual positions in institutions established in different Member States, thereby fostering knowledge transfer, skills development, collaboration, and preventing talent drain;

(g) exploring options for a common approach for the staff of the Research Infrastructures, especially in the case of a European Research Infrastructure Consortium (ERIC).

The Commission is recommended to support Member States in their endeavours, including by enabling the implementation of synergies among Union programmes, and Union and national programmes.

32. The Commission is recommended to take the following actions fostering a more balanced circulation of talents:

(a) supporting mutual learning for Member States in view of the reform of their research and innovation systems, including through calls for expression of interest to create a community of practice with training and guidance for Member States on the basis of successful pathways and solutions enabling more balanced talent circulation;

(b) monitoring mobility flows, within the Union and with third countries, through an interactive talent circulation map in the observatory on research careers referred to in point 40 of this Recommendation;

(c) facilitating transnational ties with the research and innovation diaspora and third country communities and facilitating the attraction or return of talents, via a branch of the ERA Talent Platform referred to in point 33 of this Recommendation;

(d) promoting a balanced talent circulation of researchers at Union level, by strengthening the human capital base with more entrepreneurial, managerial and better-trained researchers and innovators.

Support actions for research careers

33. The Commission and Member States are recommended to take appropriate measures to strengthen the EURAXESS portals, services, as well as the international dimension, and to develop the ERA Talent Platform as an online one-stop-shop for researchers and institutions in all sectors, with a new governance framework and a coordination role of relevant national bodies and institutions involved in service delivery. The ERA Talent Platform should allow:

(a) researchers to manage their learning and training opportunities and their careers;

(b) research and innovation institutions, employers and funders to conduct networking activities, better manage their pools of talents, collaborate and exchange best practices, while facilitating talents' attraction and retention and improving data for a better understanding of mobility trends across Europe and beyond.

Services could be broadened to include talent development and career management services, with a focus on researchers in all relevant sectors of society, including academia.

34. The Commission is recommended to ensure links and interoperability between the ERA Talent Platform and other relevant Union and national initiatives, including Europass, ESCO and EURES, to provide for an improved governance model of the platform and the underlying network of service centres to better meet the needs of researchers and research performing organisations.

35. Member States and the Commission are recommended to acknowledge the importance of the endorsement and implementation of the Charter for Researchers referred to in point 36 of this Recommendation.

36. The new Charter for Researchers set out in Annex II to this Recommendation should replace the Charter and Code for Researchers set out in the Annex to Recommendation 2005/251/EC. Member States and the Commission are recommended to encourage the endorsement and implementation of the new Charter for Researchers by research employers and funders from all sectors, including through dedicated incentives, in view of making it a structural tool in support of researchers and research careers.

37. The Commission is recommended to adjust the Human Resources Strategy for Researchers, or any future similar implementation mechanism, to the new Charter for Researchers, and to ensure continuity in respect of the institutions that have endorsed the principles of the old Charter and Code for Researchers and have adhered to the Human Resources Strategy for Researchers, notably by considering them as continuing to endorse the Charter for Researchers set out in Annex II to this Recommendation. The Commission is recommended to apply the same transitional measures to the institutions which started the Human Resources Strategy for Researchers process under the old Charter and Code for Researchers.

38. The Commission is recommended to regularly review and adapt all tools in support of research careers, based on the actual needs of researchers, in coordination with Member States and relevant stakeholders.

39. The Commission and Member States are recommended to encourage and support alliances of higher education institutions, such as the European Universities alliances, the whole European higher education, research and innovation sector and all relevant stakeholders, to pilot relevant actions foreseen by this Recommendation on the basis of a voluntary and bottom-up approach.

Monitoring of research careers

40. In addition to the overarching European Research Area monitoring systems, the Commission and Member States are recommended to monitor relevant aspects of research careers in the Union and the implementation of this Recommendation through a dedicated Observatory, to the benefit of the research community, policy makers, public administration and relevant organisations at European and national level. The Observatory should support better understanding of challenges and opportunities by researchers, and it should also promote the attractiveness of Union research performing organisations for the best talents, while guaranteeing the protection of data privacy throughout implementation.

41. The Observatory should carefully consider and identify the type of support data that would be relevant to observe research careers. Where possible, links to existing data should be considered and prioritised in order to reduce administrative burden for Member States and all relevant stakeholders. Member States are recommended to cooperate for the purpose of collecting data relevant for the implementation of the observatory in an efficient and sustainable way.

42. The Commission is invited to propose – on the basis of the data provided by the Observatory on research careers – further measures that encourage and promote the development of research careers.

43. The Commission, in collaboration with Member States, is recommended to consider relevant links between the Observatory on Research Careers and the European Higher Education Sector Observatory proposed in the European Strategy for Universities, where relevant, and thereby enhance synergies between the European Research Area and the European Education Area.

44. Member States and the Commission are recommended to consider the adaptation to the data needs of the observatory referred to in point 40 of this Recommendation of the data collected in the context of Regulation (EU) 2019/1700.

Done at Brussels, 18 December 2023.

For the Council
The President
T. RIBERA RODRÍGUEZ

ANNEX I

Examples of occupations for researchers across sectors along the R1-R4 profiles

With due regard to national competences and to facilitate the use of references to the profiles in all vacancies specifically addressed to researchers, this annex provides examples for each sector with the aim to make researchers' careers comparable and interoperable across employment sectors and countries.

Entities concerned should be mindful of the understanding of the Researcher's definition and its profiles as reflected in the Recommendation 1, 2, 5 and 6.

Table 1

Examples of Occupations in the European Framework for Research Careers

R1 - First Stage Researcher	R2 - Recognised Researcher
doctoral candidate junior academic junior research analyst junior research engineer junior researcher/scientist junior scientific officer research apprentice/intern	junior academic junior lecturer junior research analyst junior research engineer junior researcher/scientist junior scientific officer postdoctoral researcher
R3 - Established Researcher	**R4 - Leading Researcher**
accredited researcher assistant professor associate professor associate researcher principal investigator principal researcher/scientist reader research fellow research specialist scientific councillor senior academic senior lecturer senior research and development associate senior research engineer senior researcher/scientist senior scientific officer	chief scientific officer distinguished professor full professor principal investigator principal researcher/scientist reader research fellow research professor research specialist scientific councillor senior academic senior lecturer senior research and development associate senior research engineer senior researcher/scientist senior scientific officer

About the examples of researcher occupations per the R1-R4 profiles listed in Table 1, it is important to signal that:

— The examples are not intended to be exhaustive but serve as an indication of the types of titles for researchers across the R1-R4 profiles and across all sectors

— The examples consist only of titles in English although it is acknowledged that titles will differ across sectors and countries and that titles will differ across different languages

— Some researcher occupations may appear in multiple R1-R4 where the decision of profile will be dependent on the level of independence, experience, and recognition

— The final decision on whether an individual and occupation is to R1-R4 will be determined case-by-case and will be dependent upon the individual and occupation

ANNEX II

European Charter for Researchers

The European Charter for Researchers is a set of principles underpinning the development of attractive research careers to support excellence in research and innovation across Europe. The focus of the European Charter for Researchers ('Charter for Researchers') is the rights and responsibilities of researchers, employers, funders and policy makers; it consists of 20 key principles. These are classified under the following four pillars:

(a) Ethics, Integrity, Gender and Open Science;

(b) Researchers' Assessment, Recruitment and Progression;

(c) Working Conditions and Practices;

(d) Research Careers and Talent Development.

The Charter for Researchers is directed at all researchers, research performing sectors and respective umbrella organisations (stakeholders). This includes:

(a) Researchers in all sectors – academia, public and private organisations performing research;

(b) Employers of researchers in the public and private sector;

(c) Funders of research and researchers in the public and private sector;

(d) Policy makers concerned with policies relevant to the Charter.

It addresses researchers across all disciplines including Science, Technology, Engineering, Mathematics (STEM) and Social Sciences and Humanities (SSH). It covers all types of research from frontier, targeted, strategic, applied and close to market.

PILLAR 1 – ETHICS, INTEGRITY, GENDER AND OPEN SCIENCE

1. ETHICS AND RESEARCH INTEGRITY
2. FREEDOM OF SCIENTIFIC RESEARCH
3. OPEN SCIENCE
4. GENDER EQUALITY
5. EMBRACING DIVERSITY
6. THE RESEARCHER
7. FREE CIRCULATION OF RESEARCHERS
8. SUSTAINABILITY OF RESEARCH

This pillar gathers the fundamental principles of the Charter for Researchers and its commitment towards supporting excellence in research, understood in this context as fostering the best possible research teams and projects, free from gender and other biases. The principles under this pillar are expected to contribute to the foundations of the vision of a revitalised European Research Area, and to inspire European researchers, research employers, funders and policy makers. Because of the transversal nature of all these values, they are expected to be mainstreamed and taken into consideration in the deployment of the rest of the principles.

(1) Ethics and Research Integrity ([1])

Researchers should comply with strict ethics rules and approach their work with honesty; reliability; objectivity; impartiality and independence; open communication; duty of care; fairness and responsibility for future science generations. These are the foundations of responsible and trustworthy research free from undue influence (including foreign interference and conflict of interest). They are a prerequisite for achieving excellence, and they underpin the responsibility of researchers to guard against biases and methodological shortcuts.

([1]) Research Integrity – Council conclusions (adopted on 1 December 2015) – Council doc. 14853/15.

Researchers should adhere to the recognised ethical practices and fundamental ethical principles appropriate to their discipline(s) as well as to ethical standards as documented in the different national, sectoral or institutional Codes of Ethics.

The primary responsibility for research integrity is with researchers themselves. Researchers should be supported by an institutional culture of research integrity to create and respect rules, procedures and guidelines as well as training and mentoring based on the exchange of best practices.

In order to foster good research practices and a culture of research integrity, a number of dimensions need to be considered by all stakeholders involved, such as research integrity in research environments; training and capacity building on research integrity; research processes and policies embedding research integrity; data, publication, dissemination, review, evaluation and editing policies. Equally, mechanisms to identify, report and deal with research misconducts should be put in place.

Researchers should avoid plagiarism of any kind. Particular attention should be paid to the principles of joint ownership when research is carried out in collaboration with supervisors and/or other researchers – as appropriate to the discipline – as well as to intellectual property rules. This should apply at all stages of the research process including conception, prepaation of funding applications and the development and delivery of results. The need to validate observations by showing that findings are reproducible should not be interpreted as plagiarism, provided that the data to be confirmed are explicitly referenced.

The values of ethics and integrity are also of great importance when researchers are in a supervisory role. These shoud be applied promptly to ensure a safe, inclusive and gender equal research environment for all involved and especially when discrimination, sexual or moral harassment, hindrance to learning or research work, or unjustified personal appropriation of data or results occur.

(2) Freedom of Scientific Research

The freedom of scientific research is a common core value and principle for research cooperation within the European Research Area and with international partners. Researchers should focus their research on the good of humanity and expanding the frontiers of human knowledge, while enjoying freedom of thought, opinion and expression, the freedom to define research questions, the freedom to identify methods by which problems are solved, the freedom to choose and develop theories, the freedom to question accepted wisdom and bring forward new ideas and the freedom to associate in professional or representative academic bodies. Researchers should have the right to disseminate and publish the results of their research including through training and teaching. Researchers should, however, recognise the limitations to this freedom that could arise because of particular research circumstances – including supervision/guidance/management – or legal or operational constraints, e.g. intellectual property rights, budgetary or infrastructural reasons.

(3) Open Science

Researchers should target engagement in all aspects of Open Science ([2]) and be facilitated by their employers and funders in this regard. They should share their results openly, e.g. through open and FAIR-Findable, Accessible, Interoperable and Reusable data, open access publications, and open software, models and algorithms. They should take measures to ensure reproducibility of research results. They should aim at practicing Open Science methodologies and at engaging in open peer review. Employers and funders should support, provide the necessary tools and infrastructure, and reward a true Open Science culture across the Union, including mainstreaming open access to scholarly publications, research data and other research outputs – i.e. following the 'as open as possible, as closed as necessary' principle – and the diffusion and uptake of Open Science principles and practices, while considering differences among disciplines and cultural differences, including multilingualism, supporting the development of Open Science skills, and further developing and integrating the underpinning digital infrastructure and service.

([2]) The transition towards an Open Science system – Council conclusions (adopted on 27 May 2016) – Council doc. 9526/16.

Citizen Science

Researchers should incorporate citizen science into their projects as much as possible and where relevant. This means involving citizens in the concept, design and implementation of research projects in STEM and SSH. This is an ideal means to democratise science, build trust in science, and leverage the vast societal intelligence and capabilities to conduct excellent research and innovation.

(4) Gender Equality

All stakeholders should foster gender equality and gender balance in research teams, managerial and decision-making bodies, recruitment and promotion committees, and advisory groups. This includes fostering the integration of the gender dimension in research, teaching and innovation content in order to improve the scientific quality, excellence, and societal relevance of the produced knowledge. Gender equality also aims at combating gender-based violence and sexual harassment. Gender equality should be understood from an intersectional perspective, where different systems of power among gender and other social categories and identities intersect and reinforce each other. Sustainable institutional changes, channelled through Gender Equality plans ([3]) or similar, that allow for proper reporting of infringements and include monitoring and evaluation systems, are adequate mechanisms to promote gender equality.

A key component of the transformation of an organisation's culture for advancing gender equality is work-life balance. Work-life balance is relevant for both women and men and involves ensuring that all staff are properly supported to advance their career alongside personal responsibilities that they may hold outside of the workplace, including caring responsibilities.

(5) Embracing Diversity

A core principle of the European Research Area is to take account of diversity in the broad sense, including, *inter alia*, gender, racial or ethnic origin, religion or belief, social diversity, disability, age, sexual orientation and combating discrimination on all grounds. Employers and funders should embrace diversity in their researchers, since different life experiences add valuable perspectives to research projects. Also, diversity in participants can inform research results applying to and enriching the diverse societies we live in. Acknowledging unconscious biases, for instance in hiring, promoting and reviewing tasks, and compensating for them where possible is also needed, particularly in the realm of science.

(6) The Researcher

All researchers are engaged in the conception or creation of new scientific knowledge based on original concepts or hypotheses. Researchers are profesionals whose work should be valued, independently of the sector in which they operate. This should commence at the beginning of their careers, namely at postgraduate level, and should include all levels, regardless of their classification at national level.

Employers and funders should encourage and support non-linear and multi-career paths, to be understood as paths characterised by geographical, disciplinary, inter-sectoral, and inter-organisational mobility – e.g. secondments. They should also encourage hybrid paths combining simultaneously different sectors, which should be considered on a par with linear career paths.

Professional Attitude

Researchers should be familiar with the strategic goals governing their research environment and funding mechanisms and should seek all necessary approvals before starting their research or accessing the resources provided. Researchers should make every effort to ensure that their research is relevant to society by allowing a better understanding of the world, and does not needlessly duplicate research previously carried out elsewhere. This involves efficient research results' valorisation.

([3]) See Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions – A Union of Equality: Gender Equality Strategy 2020-2025, COM(2020) 152 final.

There should be clear communication among researchers and employers, funders, or supervisors when a research project is delayed, redefined or completed; notice should be given if a research project is to be terminated early or suspended for any reason.

Accountability

Being accountable means taking responsibility for one's actions when carrying out research. Researchers need to be aware that they are accountable towards their employers, funders or other related public or private bodies as well as, on more ethical grounds, towards society. Researchers funded by public funds are also accountable for the efficient use of taxpayers' money. Consequently, they should adhere to the principles of sound, transparent and efficient financial management and cooperate during any authorised audits of their research, whether undertaken by their employers/funders or by ethics committees. This expectation requires them to serve as examples of ethical behaviour for their peers and for the broader society.

Methods of collection and analysis, the outputs and, where applicable, details of the data should be open to internal and external scrutiny, whenever necessary and as requested by the appropriate authorities. This is also important to make the data open and help ensure the reproducibility of results.

(7) Free circulation of researchers

Employers and funders should promote free circulation of researchers, scientific knowledge and technology, while attracting talent and avoiding potential talent drain. They should recognise the value of geographical, inter-institutional, inter-sectoral, inter-disciplinary and trans-disciplinary mobility as important means of enhancing knowledge and professional development at any stage of a researcher's career and fully value and acknowledge any mobility experience within their career progression/appraisal system. Virtual mobility has been proved as a valid asset and can also be considered. This also requires that the necessary administrative instruments be put in place to allow the portability of both grants and social security provisions, in accordance with national legislation.

(8) Sustainability of Research

Researchers, employers and funders should promote the sustainable implementation of research activities in line with current and future policy initiatives adopted to progress society such as the European Green Deal, the United Nation's 2030 Agenda and the Sustainable Development Goals. Researchers should be supported by an institutional culture of sustainable research management, as well as training and mentoring based on the exchange of best practices. They should take the lead in reducing their carbon emissions in a way that sets a positive example to others within the research community.

The European Commission's 'MSCA Green Charter', developed in the framework of the Marie Skłodowska-Curie Actions (MSCA), can be used as reference point.

PILLAR 2 – RESEARCHERS ASSESSMENT, RECRUITMENT AND PROGRESSION

1. RESEARCHERS' ASSESSMENT
2. RECRUITMENT
3. SELECTION
4. CAREER PROGRESSION

Researchers' assessment should ensure an equal recognition and reward of researchers' careers regardless of the sector of employment or activity and follow an unbiased talent-based approach. Fair recruitment and selection of researchers' policies are fundamental for achieving an open labour market for researchers, contributing to the advancement of the European Research Area.

(1) Researchers' Assessment

Researchers' assessment should enable evaluating the performance of researchers and research to achieve the highest quality and impact. This requires recognition of increasingly diverse activities, practices and research outputs. Consequently, assessment should be based primarily on qualitative judgement, for which peer review and review by other pertinent experts is central, supported by the responsible use of quantitative indicators. Contributions to innovation should also be recognised, particularly for candidates from an industrial background.

Employers and funders should support a system for the assessment and reward of researchers that considers the overall quality of their impact on society, science and innovation, the diversity of activities performed, Open Science practices, and the value of geographical, inter-disciplinary and inter-sectoral mobility. Such a system should:

(a) be based on qualitative unbiased judgement provided by peers and pertinent experts, supported by the responsible use of quantitative indicators;

(b) reward quality and the various potential impacts of research on society, science and innovation;

(c) recognise a diversity of outputs, *inter alia* publications, datasets, software, methodologies, protocols, patents, models, theories, algorithms, workflows, exhibitions, strategies, policy contributions; a diversity of activities, *inter alia* mentoring, research supervision, leadership roles, entrepreneurship, FAIR data management – following the principles Findable, Accessible, Interoperable and Reusable –, peer review, teaching, knowledge valorisation, industry-academia cooperation, support for evidence-informed policy-making, interaction with society, management and leadership, supervision, teamwork, services to society, science communication and methodological rigor; and a diversity of practices, *inter alia* Open Science, early knowledge and data sharing, and open collaboration, in addition to all mobility experiences including geographical, inter-sectoral, inter-institutional, inter- and trans-disciplinary;

(d) ensure that researchers' activity meets high standards of ethics and integrity, applies appropriate conduct of research, and values good practices, including open practices for sharing research results and methodologies, whenever possible;

(e) use assessment criteria and processes that respect the variety of research disciplines and national contexts;

(f) support a diversity of researcher profiles and career paths, and value individual contributions, but also the role of teams, collaborative work, and inter-disciplinarity;

(g) ensure gender balance, gender equality, equal opportunities and inclusiveness.

To ensure coherence in the implementation of these principles, employers and funders should foster continuous training for the actors involved in the assessment and reward process.

(2) Recruitment

In accordance with the principles of academic freedom and institutional autonomy, employers and funders are recommended to establish recruitment and selection procedures which are open, transparent and merit-based, without penalisation for career breaks or non-linear, multi-career and hybrid paths. They should seek excellence, gender equality, diversity, and be tailored to the type of position advertised. Advertisements should include a comprehensive description of the knowledge and competencies required, including a description of the working conditions and entitlements, career development prospects and an overview of the timeline. Candidates should be informed, prior to the selection, about the recruitment process and the selection criteria, the number of available positions and career development prospects. Committee members should also be made aware of and trained about fair recruitment principles.

Variations in the chronological order of CVs

Career breaks or variations in the chronological order of CVs should not be penalised, but regarded as an evolution of a career, and consequently, as a potentially valuable contribution to the professional development of researchers towards a multi-dimensional career track. Candidates should therefore be allowed to submit evidence-based CVs, reflecting a representative array of achievements and qualifications appropriate to the post for which they are applying.

Seniority

The level of qualifications required should be in line with the needs of the position and not set as a barrier to entry. Evaluation of qualifications should focus on judging the achievements of the person rather than their circumstances or the reputation of the institution where the qualifications were acquired. As professional qualifications may be acquired at an early stage of a long career, the pattern of lifelong professional development should also be encouraged and recognised.

(3) Selection

As part of recruitment, the selection process should take into consideration the whole range of experience of the candidates. While focusing on their overall potential as researchers, their creativity – as assessed on the basis of their innovative research methods, approaches and outputs – and level of independence should also be considered. Selection committees should bring together diverse expertise, competences and experience relevant to assess the candidate. Selection committees should also have adequate gender balance and, where appropriate and feasible, include members from different sectors – public and private – and disciplines, and from other countries. Whenever possible, a wide range of selection practices should be used, such as external expert assessment and face-to-face and online interviews. Members of selection panels should be adequately trained especially for minimising gender bias or any other possible unconscious biases. All candidates should be informed after the selection process about the strengths and weaknesses of their application.

Non-discrimination

Employers and funders of researchers should not discriminate against researchers in any way based on gender, age, ethnic, national or social origin, religion or belief, sexual orientation, language, disability, political opinion, social or economic condition.

(4) Career progression

Employers and funders should introduce for all researchers, including senior researchers, evaluation/appraisal systems for assessing the performance of their duties on a regular basis and in a transparent manner by an independent – and, in the case of senior researchers, preferably international – committee. Non-linear and multi-career paths, characterised by geographical, sectoral, and inter-organisational mobility, or hybrid paths, characterised by the simultaneous combination of sectors, deserve full recognition and consideration on a par with linear career paths – to be understood as careers following a straight line of progression from one position to another, usually within the same field or discipline.

Such evaluation and appraisal procedures should take due account of researchers' overall potential, their research creativity, their research output – e.g. publications, data, software, models, algorithms, methods, protocols, patents, policy contributions –, their activities – e.g. management and leadership, teaching/lecturing, peer review, supervision, mentoring, entrepreneurship, knowledge valorisation, national or international collaboration, administrative duties, service to society, science communication and interaction with society –, their research behaviour – e.g. ethics and integrity practice, methodological rigour, early knowledge and data sharing, open collaboration – and their mobility, and should be taken into consideration in the context of career progression.

A transparent, structured, inclusive and gender-equal career accession and progression system is needed to reinforce careers in academia, up to the top positions. The development of tenure-track-like systems – to be understood as defined frameworks where a fixed-term contract has the prospect of a progression to a permanent position subject to positive evaluation – could be considered for this purpose at the level of the Member States and research performing organisations.

Co-authorship

Co-authorship should be viewed positively by institutions when evaluating staff, as evidence of a constructive approach to the conduct of research. Employers and funders should therefore develop strategies, practices and procedures to provide researchers, including those at the beginning of their research careers, with the necessary framework conditions so that they can enjoy the right to be recognised, listed and/or quoted, in the context of their actual contributions, as co-authors of papers, co-inventors of patents, etc., or to publish their own research results independently from their supervisors. They should also offer training and workshops to researchers, especially early-career researchers, on ethical authorship practices, including the understanding of individual contributions and their rights and responsibilities.

Recognition of mobility experience

Any relevant mobility experience, e.g. a stay in another country/region or in another research setting – public or private – or a change from one discipline or sector to another, whether as part of the initial research training or at a later stage of the research career, or virtual mobility experience should be considered as a valuable contribution to the professional development of a researcher.

PILLAR 3 - WORKING CONDITIONS AND PRACTICES

1. WORKING CONDITIONS, FUNDING AND SALARIES
2. STABILITY OF EMPLOYMENT
3. CONTRACTUAL AND LEGAL OBLIGATIONS
4. DISSEMINATION AND EXPLOITATION OF RESULTS

Improving researchers' working conditions should be at the core of the Union policy framework for research careers. Within this area several actions are proposed to contribute to the stability of employment and to the definition of researchers' labour rights and obligations, subject to national legislation and circumstances. The need for employers and funders to develop a research culture for research excellence and facilitate a thriving researcher community is also emphasised.

(1) Working conditions, funding and salaries

Employers and funders should ensure that the working conditions for researchers, including those with disabilities, provide, where appropriate, the flexibility and accessibility deemed essential for successful research performance, in accordance with existing national legislation and circumstances, and with national or sectoral collective-bargaining agreements. They should aim to provide working conditions for combining personal life, family, caring, health, safety, and overall wellbeing, without prejudice to research careers. Particular attention should be paid, *inter alia*, to flexible working hours, part-time working, remote working and sabbatical leave, as well as to the necessary financial and administrative provisions governing such arrangements. Employers should provide working conditions and environment that promote the mental health and physical wellbeing of researchers, including appropriate procedures for preventing and tackling gender-based violence, including sexual harassment.

Research environment

Employers and funders of researchers should ensure that the most stimulating research or research training environment is created which offers appropriate equipment, facilities and opportunities, including for remote collaboration over research networks, and the highest level of health and safety in line with Union, national and sectoral regulations. Funders should ensure that adequate resources are provided in support of the agreed work programme. In particular, it is important to have qualified support staff – e.g. research managers and administrators.

Complaints/appeals

Employers and funders of researchers should establish, in compliance with relevant national, Union or international law, rules and regulations, appropriate procedures, possibly in the form of an impartial ombudsperson, to deal with complaints/appeals of researchers, including those concerning conflicts among supervisors and First Stage (R1)/Recognised (R2) researchers. Such procedures should provide all research staff with confidential and informal assistance in resolving work-related conflicts, disputes, and grievances, with the aim of promoting fair and equitable treatment within the institution and improving the overall quality of working conditions and environment.

Participation in organisation governance

Employers and funders of researchers should recognise as wholly legitimate, and indeed desirable, that researchers be represented in the relevant information, consultation and decision-making bodies of the institutions for which they work, to protect and promote their individual and collective interests and to actively contribute to the workings of the institution.

Funding and salaries

Employers and funders of researchers should ensure that researchers, irrespective of their status, enjoy fair and attractive remuneration conditions – funding and salaries – with adequate and equitable social security provisions – including sickness, healthcare and parental benefits, pension rights and unemployment benefits, old-age and survivor's benefits, invalidity benefits and benefits in respect of accidents at work and occupational disease – in accordance with existing national legislation and with national or sectoral collective bargaining agreements.This should include researchers at all career stages, including First Stage Researchers (R1), commensurate with their legal status, performance and level of qualifications and responsibilities. Researchers should be made aware of their rights and obligations when it comes to understanding how their salaries are being taxed, and should be provided with transparent information on social protection rights such as national pension rights.

(2) Stability of employment

Employers and funders should take resolute actions to counter the phenomenon of precarity and to support job security and stability. This could, on a voluntary basis, include the establishment of a maximum threshold for the number of fixed-term contracts per organisation in the overall researchers' human resources. Whenever permanent, long-term or highly recurrent research tasks are being fulfilled, permanent or open-ended contracts are recommended as the appropriate instrument. Researchers under fixed-term contracts should benefit from specific career development and advisory services to ensure career continuity.

Early-career researchers (R1-R2)

Precarity of employment is a particular issue in academia. To counter this situation is recomended the implementation – subject to national legislation and circumstances – of specific measures in support of early-career researchers with regard to providing First Stage researchers (R1) with social protection and working conditions applicable to researchers in other career stages and with adequate income, promoting involvement of early-career researchers into research teams avoiding the demand of tasks unrelated to their scientific training and recognising inter-institutional, inter-sectoral, inter-disciplinary and geographical mobility, including virtual mobility. Additionally, appointing institutions should establish clear rules and explicit guidelines for the recruitment and appointment of recognised researchers (R2), including the maximum duration and the objectives of these appointments. Such guidelines should consider time spent in prior postdoctoral appointments at other institutions and take into consideration that the postdoctoral status should be transitional, with the primary purpose of providing additional professional development opportunities for a research career in the context of long-term career prospects with fixed-term contract or tenure.

Employers and funders should make their best effort as regards informing early-career researchers about career opportunities, within and beyond academia, offering broad professional development, especially during the R2 stage, more transparent and predictable career prospects, and work-based learning opportunities in a diversity of sectors.

(3) Contractual and legal obligations

Researchers at all levels should be familiar with the national, sectoral or institutional regulations governing training and working conditions. This includes intellectual property rights regulations, and the requirements and conditions of any sponsor or funders, independently of the nature of their contract. Employers and funders should provide copies of these documents in English. Researchers should adhere to such regulations by delivering the required results – e.g. thesis, publications, patents, reports, new products, etc. – as set out in the terms and conditions of the contract or equivalent document.

Given the increasing focus on knowledge security, researchers should always adopt safe working practices, in line with relevant national and Union legislation, including taking the necessary precautions for health and safety and for recovery from cybersecurity attacks, and information technology disasters, e.g. by preparing proper back-up strategies. They should also be familiar with the current national and Union legal requirements regarding data protection and confidentiality protection requirements and undertake the necessary steps to always fulfil them.

(4) Dissemination and exploitation of results

Open Science should be practiced by all researchers to ensure, in compliance with their contractual arrangements, that the results of their research are disseminated, made openly available and exploited, e.g. communicated, transferred into other research settings and, if appropriate, commercialised. Senior researchers are expected to take a lead in ensuring that research is fruitful and that results are either exploited commercially and/or made accessible to the public whenever the opportunity arises.

Researchers should be facilitated in this regard by their employers and funders through the relevant skills training and access to the appropriate funding, infrastructure and support. The engagement of researchers in Open Science practices should be recognised, incentivised and rewarded by employers and funders in recruitment, career progression and funding programme assessment.

Intellectual Assets including Intellectual Property Rights

Employers and funders should ensure that researchers at all career stages are adequately compensated for the benefits resulting from the exploitation – if any – of their research and innovation activities results, where appropriate by guaranteeing co-ownership of the intellectual property rights such as copyright. Employers and funders should address this explicitly in their intellectual assets management strategy and should make the strategy publicly available. The intellectual assets management strategy should cover the creation, management, ownership and utilisation of all types of intellectual assets – including peer-reviewed publications, data, know-how, standards –, and support Open Science practices.

The strategy should explicitly refer to ownership provisions and access rights to researchers and/or, where applicable, to their employers or other parties, including industry partners, as possibly provided for under specific collaboration agreements or other types of agreement.

Public Engagement

Researchers should ensure that their research activities are made known to society at large in such a way that they can be understood by non-specialists, thereby improving the public's understanding of science. Direct engagement with civil society and citizens will help researchers to better understand public interest in priorities for research and the public's concerns, and to harness the potential of co-design and co-creation with society where relevant.

PILLAR 4 -RESEARCH CAREERS AND TALENT DEVELOPMENT

1. VALUING DIVERSE RESEARCH CAREERS
2. CAREER DEVELOPMENT AND ADVICE
3. CONTINUOUS PROFESSIONAL DEVELOPMENT
4. SUPERVISION AND MENTORING

The research community is diverse in talents, skills, competences and capacities and roles. The more these talents are fostered and developed, the better the research quality and societal relevance of the produced knowledge. Encouraging continuous professional development along with skills training is needed to maintain competence and provide researchers with a broad range of career opportunities in the public and private sectors.

(1) Valuing Diverse Research Careers

Employers and funders should recognise that researchers may have highly diverse careers both in research and in other functions. Diversification typically includes mobility in all its forms: inter/intra-national, inter-sectoral, inter-institutional, inter- and trans-disciplinary and virtual mobility. This requires more talent-based and diversity-sensitive quality assessment, fostering responsible use of metrics, considering diverse contributions and their potential impacts, diverse activities and practices like teaching and skills, peer review, management and leadership, supervision, mentoring, knowledge valorisation, and technology transfer activities, entrepreneurship and collaboration with industry, developing evidence-informed policymaking activities, science communication and interaction with society, and Open Science practices, team science, among others as well as mobility.

Employers and funders should put measures in place to make researchers, in particular early-career ones, aware of opportunities available in all relevant sectors and to promote a culture of diversification of careers for better personal and professional development. This will require career advisory, mentoring and support services to stimulate inter-sectoral, inter-disciplinary and geographical mobility, as well as the creation and development of entrepreneurial activities.

(2) Career Development and Advice

Employers and funders of researchers should draw up, preferably within the framework of their human resources management, a specific career development strategy for researchers at all stages of their career, regardless of their contractual situation, including for researchers on fixed-term contracts. In this context, researchers should be supported to develop an individual career plan to identify the necessary training and research required to attain their career goals. It should include the availability of mentors involved in providing support and guidance for the personal and professional development of researchers, thus motivating them and contributing to reducing any insecurity in their professional future. All researchers should be made familiar with such provisions and arrangements and be proactive and responsible for their career development.

Employers and funders should ensure, either in the institutions concerned or through collaboration with other structures, accessible and up-to-date career guidance and job placement assistanceproviding information, guidance and support for career development both within and beyond the institution concerned. This should be offered to researchers at all stages of their careers, regardless of their contractual situation.

(3) Continuous Professional Development

Researchers at all career stages should seek proactively and be given opportunities by their employer/funder to continually improve themselves by regularly updating and expanding their skills and competencies. This may be achieved by a variety of means including, but not restricted to, formal training, workshops, conferences and e-learning or collaboration within a team and the respective networks. Particular attention should be paid to the training of First Stage Researchers (R1), the majority of whom are PhD candidates at the beginning of their research career.

Access to research training and continuous development

Employers and funders should ensure that all researchers at any stage of their career, regardless of their contractual situation, are given the opportunity for professional development and for improving their employability through access to measures for the continuing development of skills and competencies. Employers and funders should take action to support the development and provision of targeted training, to encourage up-skilling and re-skilling opportunities for researchers with a lifelong learning perspective and to foster inter-sectoral and inter-disciplinary mobility. Such measures should be regularly assessed for their accessibility, take-up and effectiveness in improving competencies, skills and employability.

Employers and funders should attribute adequate relevance to the need to foster entrepreneurial competences in researchers, with the objective of allowing those who undertake an entrepreneurial career path to couple their knowledge production capabilities with knowledge valorisation proficiency, turning innovative ideas into business and fostering innovation and progress.

Employers and funders should take steps to ensure that doctoral training is compatible with interoperable careers in all relevant sectors and for the practice of Open Science, including by making use of the European Competence Framework for Researchers (ResearchComp), the Principles for Innovative Doctoral Training, the European Code of Conduct for Research Integrity, and of any other future initiatives taken for the purpose of strengthening transversal skills of researchers.

Validation of skills

As part of broadening researchers' skills sets, employers and funders should provide for the appropriate assessment and evaluation of formal and informal training, including on-the-job skills and training, particularly within the context of international, intersectoral and inter-disciplinary mobility. The assessment should be done in a fair and transparent manner within a reasonable timeframe.

Teaching

Teaching is an essential means for the structuring and dissemination of knowledge and is a valuable option within a researcher's career path. Teaching should benefit from and make use of scientific knowledge and promote research interest among students. Involvement of researchers in teaching should be fully supported and recognised, and might vary at different moments within a career. Special attention should be paid to researchers at the beginning of their careers, ensuring that they are rightly supported and that teaching responsibilities – including lecturing, tutoring, supervising and mentoring – are compatible with their research activities or research training.

Employers and funders should ensure that teaching duties are adequately remunerated and considered in the evaluation/appraisal systems from an early stage of researchers' careers. It should also be ensured that time devoted by senior members of staff to the training and mentoring of early-career researchers – R1, R2 – is counted as part of their teaching commitment. Suitable training should be provided for teaching and coaching activities as part of the initial training and professional development of researchers.

(4) Supervision and Mentoring

Proper people and team management are crucial in research working environments as science is by definition a joint endeavour. The necessary training, tools and evaluation mechanisms should be put in place so as to ensure that senior and leading researchers manage their staff and teams in a fair and non-discriminatory manner, free of gender bias and other types of biases – such as biases based on religion, sexual orientation, race, ethnicity, socioeconomic background, etc. –, and establish fruitful and cooperative working relationships with their peers. This should contribute to healthy, fair, creative environments where every individual is respected, duly motivated, recognised and their well-being fostered.

Employers and funders should ensure that a person or a group of persons is clearly identified to whom First Stage (R1) and Recognised (R2) researchers can refer for the performance of their duties and should inform researchers accordingly.

Such arrangements should clearly stipulate that the proposed supervisor have an adequate level of expertise in supervising research and have the time and commitment to offer the research trainee appropriate support; moreover, they should provide for the necessary progress and review procedures, as well as for the necessary feedback mechanisms.

Specific provisions for the integration, research support and career development of researchers, for their mentoring and wellbeing, for communication and conflict resolution as well as for the training and professional development of supervisors are provided in the MSCA Guidelines on Supervision. The MSCA Guidelines on Supervision are a set of recommendations for individuals and institutions who receive MSCA funding. The Guidelines promote effective supervision, mentoring and appropriate career guidance.

Relations with supervisors

Researchers in their training phase should have a structured and regular relationship with their supervisor(s) and faculty/departmental representative(s) and take full advantage of their relationship with them. Supervisors should also actively support especially early-stage researchers by organising feedback meetings with them and promoting training activities relevant to their work.

This includes keeping records of all work progress and research findings, obtaining feedback by means of reports and seminars, applying such feedback and working in accordance with agreed schedules, milestones, deliverables and/or research outputs.

Senior researchers

Senior researchers – R3 and R4 – should devote particular attention to their multi-faceted role as supervisors, mentors, career advisors, leaders, project coordinators, managers or science communicators. They should perform these tasks to the highest professional standards and have access to the appropriate training. Regarding their role as supervisors or mentors of researchers, senior researchers should build up a constructive and positive relationship with First Stage (R1) and Recognised (R2) researchers, in order to set the conditions for efficient transfer of knowledge and for the further successful development of their careers. Supporting the career development of R1 and R2 researchers in communicating experience and values in a trusted and confidential environment is a high-responsibility role.

Denumire	Cod
Matematica	1010101010
Horticultura	2050202010
Zootehnie	2050104010
Agricultură	2050101010
Medicina Veterinara	3040101010
Biologie	3010101010
Matematici aplicate	1010101020
Matematica informatica	1010101030
Informatica	1010204010
Informatica aplicata	1010204020
Fizica	1020102010
Fizica medicala	1020102020
Biofizica	1020102030
Fizica informatica	1020102040
Chimie	1030103010
Biochimie tehnologica	1030103020
Radiochimie	1030103030
Chimie informatica	1030103040
Ingineria substantelor anorganice si protectia mediului	1030205010
Chimia si ingineria substantelor organice, petrochimie si carbochimie	1030205020
Stiinta si ingineria materialelor oxidice si nanomateriale	1030205030
Stiinta si ingineria polimerilor	1030205040
Ingineria si informatica proceselor chimice si biochimice	1030205050
Inginerie chimica	1030205060
Controlul si securitatea produselor alimentare	1030205070
Inginerie biochimica	1030205080
Ingineria fabricatiei hartiei	1030205090
Geografie	1040102010
Geografia turismului	1040102020
Geografie	1040102030
Hidrologie si meteorologie	1040102040
Planificare teritoriala	1040102050
Geologie	1040103010
Geochimie	1040103020
Medicina	3030101010

Denumire	Cod
Chimia mediului	1040104010
Ecologie si protectia mediului	1040104020
Geografia mediului	1040104030
Fizica mediului	1040104040
Stiinta mediului	1040104050
Constructii civile, industriale si agricole	2010106010
Cai ferate, drumuri si poduri	2010106020
Constructii si fortificatii	2010106030
Amenajari si constructii hidrotehnice	2010106040
Constructii miniere	2010106050
Inginerie sanitara si protectia mediului	2010106060
Îmbunatatiri funciare si dezvoltare rurala	2010106070
Inginerie civila	2010106080
Inginerie urbana si dezvoltare regionala	2010106090
Instalatii pentru constructii	2010107010
Instalatii si echipamente pentru protectia atmosferei	2010107020
Instalatii pentru constructii - pompieri	2010107030
Stiintele solului	2050101020
Montanologie	2050101030
Protectia plantelor	2050101040
Exploatarea masinilor si instalatiilor pentru agricultura si industria alimentara	2050101050
Biotehnologii	2050105010
Peisagistica	2050202020
Piscicultura si acvacultura	2050104020
Asistenta medicala generala	3030101040
Moase	3030101050
Radiologie si imagistica	3030102010
Laborator clinic	3030102020
Balneofiziokinetotera pie si recuperare	3030102030
Audiologie si protezare auditiva	3030102070
Nutritie si dietetica	3030102090
Sisteme electrice	2020109010
Electronica de putere si actionari electrice	2020109020

Denumire	Cod
Electrotehnica	2020109030
Instrumentatie si achizitii date	2020109040
Electromecanica	2020109050
Inginerie electrica si calculatoare	2020109060
Masuratori terestre si cadrastu	2030203010
Topogeodezie si automatizarea asigurarii topogeodezice	2030203020
Cadastru si managementul proprietatilor	2030203030
Geodezie si geoinformatica	2030203040
Constructii aerospatiale	2040104010
Sisteme de propulsie	2040104020
Echipamente si instalatii de aviatie	2040104030
Inginerie si management aeronautic	2040104040
Aeronave si motoare de aviatie	2040104050
Navigatie aeriana	2040104060
Silvicultura	2050403010
Exploatari forestiere	2050403020
Cinegetica	2050403030
Inginerie economica in agricultura	2050501010
Inginerie si managemnt in alimentatie publica si agroturism	2050501020
Calculatoare	2060101010
tehnologia informatiei	2060101020
Calculatoare si sisteme informatice pentru aparare si securitate nationala	2060101030
Ingineria informatiei	2060101040
Masini si utilaje de geniu	2070102010
Sisteme pentru baraje de mine, distrugeri si mascare	2070102020
Armament, rachete, munitii de aviatie si sisteme de salvare	2070108010
Munitii, rachete, explozivi si pulberi	2070108020
Armament, aparatura artileristica si sisteme de conducere a focului	2070108030
Sisteme integrate de armament si munitie	2070108040
Biochimie	3020101020
Medicina dentara	3050101020
Tehnica dentara	3050102040
Asistenta dentara	3050102050

Denumire	Cod
Asistenta de profilaxie stomatologica	3050102080
Framacie	3060101030
Asistenta de farmacie	3060102060
Drept	4010101010
Drept european si international	4010101020
Administratie publica	4020105010
Administratie europeana	4020105020
Asistenta manageriala si secretariat	4020105030
Politie locala	4020105040
Servicii si politici de sanatate publica (Public Health)	4020105050
Jurnalism	4030106010
Comunicare si relatii publice	4030106020
Publicitate	4030106030
Stiinte ale informarii si documentarii	4030106040
Asistenta sociala	4040102010
Sociologie	4040101010
Antropologie	4040101020
Resurse umane	4040101030
Relatii internationale si studii europene	4050104010
Stiinte politice	4050203010
Studii de securitate	4050203020
Comunicare si relatii publice - informatii	4060101060
Psihologie - informatii	4060101070
Securitate si aparare	4060101090
Conducere interarme - forte terestre	4060301010
Conducere interarme - forte navale	4060301020
Conducere interarme - forte aeriene	4060301030
Conducere logistica	4060301040
Managementul organizatiei	4060301050
Managament economico-financiar	4060301080
Administrarea afacerilor	4070103010
Economia firmei	4070103020
Economia comertului, turismului si serviciilor	4070103030

Denumire	Cod
Merceologie si managementul calitatii	4070103040
Economia comertului, turismului, serviciilor si managementul calitatii	4070103050
Administrarea afacerilor in serivicii de ospitalitate	4070103060
Administrarea afacerilor in comert, turism, servicii, merceologie si managementul calitatii	4070103070
Cibernetica economica	4070105010
Statistica si previziune economica	4070105030
Informatica economica	4070205020
Contabilitate si informatica de gestiune	4070104010
Economie generala	4070101010
Economie agroalimentara	4070101020
Economia mediului	4070101030
Economie si comunicare economica in afaceri	4070101040
Economie agroalimentara si a mediului	4070101050
Economie generala si comunicare economica	4070101060
Economie si finante (in limba engleza - Economics and finance)	4070101070
Finante	4070102010
Management	4070107010
Managementul dezvoltarii rurale durabile	4070107020
Marketing	4070108010
Economie internationala	4070106010
Afaceri internationale	4070106020
Economie si afaceri internationale	4070106030
Psihologie	4080108010
Terapie ocupationala	4080108020
Pedagogie	4080107010
Psihopedagogie speciala	4080107020
Pedagogia invatamantului primar si prescolar	4080107030
Limba si literatura romana *1)	5010102010
Limba si literatura romana *2)	5010102020
Limba si literatura romana *3)	5010102030
Limba si literatura romana *11)	5010102040
Filologie clasica *4)	5010102050

Denumire	Cod
Traducere si interpretare	5010103010
Limbi moderne aplicate	5010103020
Filosofie	5020101010
Istorie	5030104010
Arheologie	5030104020
Arhivistica	5030104030
Muzeologie	5030104040
Istoria artei	5030104050
Studiul patrimoniului si managementul bunurilor culturale	5030105010
Arheologie, studii antice si antropologie istorica	5030105020
Turism cultural si studii muzeale	5030105030
Teologie pastorala *5)	5040101010
Teologie didactica	5040101020
^	5040101030
Teologie asistenta sociala	5040101040
Studii religioase	5040101050
Etnologie	5050105010
Studii iudaice	5050105020
Studii americane	5050105030
Studii culturale	5050105040
Studii europene	5050105050
Turism cultural	5050105060
Arhitectura 1)	5060101010
Arhitectura de interior	5060101020
Design de produs	5060101030
Conservare si restaurare de arhitectura	5060101040
Arhitectura peisajului	5060101050
Mobilier si amenajari interioare	5060101060
Tehnologie arhitecturala	5060101070
Proiectare si planificare urbana	5060202010
Urbanism si administrarea teritoriului	5060202020
Amenajarea si planificarea peisajului	5060202030
Arte plastice *9)	5070104010

Denumire	Cod
Arte decorative	5070104020
Design	5070104030
Conservare si restaurare	5070104040
Arta murala	5070104050
Pedagogia artelor plastice si decorative	5070104060
Ceramica - sticla - metal	5070104080
Arte textile - design textil	5070104090
Istoria si teoria artei	5070204070
Artele spectacolului *6)	5070101010
Teatrologie *7)	5070101020
Scenografie	5070101030
Cinematografie, fotografie, media *8)	5070202010
Filmologie	5070202020
Comunicare audiovizuala-multimedia	5070202030
Pedagogie muzicala	5070103010
Muzica religioasa	5070103020
Muzicologie	5070103030
Interpretare muzicala - instrumente	5070103050
Interpretare muzicala - canto	5070103040
Compozitie muzicala	5070103060
Dirijat	5070103070
Artele spectacolului muzical	5070103080
Educatie fizica si sportiva	6010101010
Sport si performanta motrica	6010101020
Kinetoterapie si motricitate speciala	6010102010
Tehnologia chimica a produselor din piele si inlocuitori	10302050100
Tehnologie chimica textila	10302050110
Chimie alimentara si tehnologii biochimice	10302050120
Prelucrarea petrolului si petrochimie	10302050130
Chimie militara	10302050150
Infrastructura transporturilor metropolitane	20101060100
Ingineria sistemelor electroenergetice	20202011010
Hidroenergetica	20202011020

Denumire	Cod
Termoenergetica	20202011030
Energetica industriala	20202011040
Energetica si tehnologii nucleare	20202011050
Managementul energiei	20202011060
Electronica aplicata	20201010010
Tehnologii si sisteme de telecomunicatii	20201010020
Retele si software de telecomunicatii	20201010030
Microelectronica, optoelectronica si nanotehnologii	20201010040
Telecomenzi si electronica în transporturi	20201010050
Echipamente si sisteme electronice militare	20201010060
Transmisiuni	20201010070
Inginerie geologica	20301012010
Geologia resurselor miniere	20301012020
Geologia resurselor petroliere	20301012030
Geofizica	20301012040
Inginerie miniera	20301026010
Prepararea substantelor minerale utile	20301026020
Topografie miniera	20301026030
Inginerie de petrol si gaze	20301026040
Transportul, depozitarea si distributia hidrocarburilor	20301026050
Constructii de autovehicule	20402016010
Ingineria sistemelor de propulsie pentru autovehicule	20402016020
Autovehicule rutiere	20402016030
Echipamente i sisteme de comanda i control pentru autovehicule	20402016040
Blindate, automobile si tractoare	20402016050
Ingineria transporturilor si a traficului	20403024010
Ingineria sistemelor de circulatie feroviara	20403024020
Ingineria sistemelor de circulatie rutiera	20403024030
Ingineria prelucrarii lemnului	20503014010
Ingineria si designul produselor finite din lemn	20503014020
Ingineria produselor alimentare	20501015010
Tehnologia prelucrarii produselor agricole	20501015020
Controlul si expertiza produselor alimentare	20501015030

Denumire	Cod
Pescuit si industrializarea pestelui	20501015040
Protecia consumatorului i a mediului	20501015050
Extracte si aditivi naturali alimentariˆ)	20501015060
Automatica si informatica aplicata	20602022010
Echipamente pentru modelare, simulare si conducere informatizata a actiunilor de lupta	20602022020
Ingineria sistemelor multimedia	20602022030
Sisteme si echipamente termice	20701018010
Masini si sisteme hidraulice si pneumatice	20701018020
Mecanica fina si nanotehnologii	20701018030
Masini si echipamente miniere	20701018040
Inginerie mecanica	20701018050
Masini si instalatii pentru agricultura si industrie alimentara	20701018060
Utilaje petroliere si petrochimice	20701018070
Utilaje pentru transportul si depozitarea hidrocarburilor	20701018080
Echipamente pentru procese industriale	20701018090
Utilaje tehnologice pentru constructii	207010180100
Ingineria si managementul resurselor tehnologice în constructii	207010180110
Utilaje pentru textile si pielarie	207010180120
Vehicule pentru transportul feroviar	207010180130
Utilaje si instalatii portuare	207010180140
Ingineria designului de produs (Product Design Engineering)	207010180150
Tehnologia constructiilor de masini	20701013010
Masini-unelte si sisteme de productie	20701013020
Ingineria sudarii	20701013030
Design industrial	20701013040
Ingineria si managementul calitatii	20701013050
Ingineria securitatii în industrie	20701013060
Nanotehnologii si sisteme neconventionale	20701013070
Tehnologia si designul produselor textile	20701013080
Tehnologia si designul confectiilor din piele si înlocuitori	20701013090
Ingineria sistemelor de energii regenerabile	207010130100
Tehnologia tricotajelor si confectiilor	207010130110
Ingineria prelucrarii materialelor polimerice, textile si compozite	207010130120

Denumire	Cod
Logistica industriala	207010130130
Inginerie industriala (Industrial Engineering)	20701013014 0
Navigatie si transport maritim si fluvial	20702021010
Navigatie, hidrografie si echipamente navale	20702021020
Electromecanica navala	20702021030
Inginerie medicala	20702027010
Optometrie	20702027020
Biotehnologii industriale	20702027030
Inginerie fizica	20702027040
Informatica industriala	20702027050
Informatica aplicata în inginerie electrica	20702027060
^)	20702027070
Matematica si informatica aplicata în inginerie	20702027080
Fizica tehnologica	20702027090
Bioinginerie	207020270100
Biomateriale si dispozitive medicale	207020270110
Echipamente si sisteme medicale	207020270120
Arhitectura navala	20704020010
Sisteme si echipamente navale	20704020020
Mecatronica	20701025010
Robotica	20701025020
Stiinta materialelor	20701017010
Ingineria elaborarii materialelor metalice	20701017020
Ingineria procesarii materialelor	20701017030
Informatica aplicata în ingineria materialelor ^)	20701017040
Ingineria si protectia mediului în industrie	20701019010
Ingineria sistemelor biotehnice si ecologice	20701019020
Ingineria si protectia mediului în industria chimica si petrochimica	20701019030
Ingineria si protectia mediului în agricultura	20701019040
Ingineria dezvoltarii rurale durabile	20701019050
Ingineria mediului	20701019060
Ingineria valorificarii deseurilor	20701019070
Reconstructie ecologica	20701019080

Denumire	Cod
Inginerie economica industriala	20701023010
Inginerie economica în domeniul mecanic	20701023020
Inginerie economica în constructii	20701023030
Inginerie si management naval si portuar	20701023040
Inginerie economica în domeniul transporturilor	20701023050
Inginerie economica în domeniul electric, electronic si energetic	20701023060
Inginerie economica în industria chimica si de materiale	20701023070
^	20701023080
^	20701023090
Inginerie si management în industria turismului	207010230100
Inginerie si management forestier	207010230110
Ingineria si managementul afacerilor	207010230120
Comunicare publica si interculturala în domeniul securitatii si apararii	40601010110
Sisteme informationale	40601010120
Studii de securitate si informatii	40601010130
Ordine si siguranta publica*12)	40602010160
Conducere militara	40603010100
Managementul traficului aerian	40603010140
Management în aviatie	40603010150
Managementul sistemelor de rachete si artilerie antiaeriene %)	40603010160
Moda - design vestimentar	50701040100
Scenografie si eveniment artistic	50701040110
Design ambiental	50701040120
Arta monumentala	50701040130
Arta sacra	50701040140

Excelența HR în cercetare

Descrierea procesului

Descrierea procesului

Numărul cazului

2022RO843264

Nume Organizație în curs de revizuire

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

Datele de contact ale organizației

Bogdan Petriceicu Hasdeu, nr. 8 , BUCURESTI, 050568, Romania

Data și codul de aprobare

06.10.2022

Data depunerii la Comisia Europeană

06.11.2024

Proces

Procesul HRS4R trebuie să implice toate departamentele de management direct sau indirect responsabile de problemele de resurse umane ale cercetătorilor. Acestea vor de obicei includ prorectorul pentru cercetare, șeful personalului și alți membri ai personalului administrativ. În plus, strategia HRS4R trebuie să se consulte părțile interesate săi și să implice o comunitate reprezentativă de cercetători variind de la procesul R1 la R4 și , precum și să numească un Comitet care supraveghează un grup de lucru responsabil de implementarea procesului.

Vă rugăm să furnizați numele, funcția și linia/departamentul de conducere ale persoanelor care sunt implicate direct sau indirect în HRS4R proces în organizația dvs.:

Nume	Pozi ie	Direcție Comitet	Lucru grup	Linie de management/ Departament
Acad. Maya Simionescu	R4	■	☐	Director
Acad. Ileana Mândușeanu	R4	☐	■	Director adjunct
Felicia Antohe	R4	■	☐	secretar al Consiliului științific
Anca SIMA	R4	■	☐	Departament șef
Manuela Calin	R4	■	☐	Departament șef
Anca Gafencu	R4	☐	■	Departament șef
Alexandrina Burlacu	R4	☐	■	Departament șef
Adrian Manea	R4	☐	■	Departament șef
Adriana Georgescu	R4	☐	■	Departament șef
Loredan St. Niculescu	R3	■	☐	Departament șef

Nume	Pozi ie	Direcție Comitet	Lucru grup	Linie de management/ Departament
Titorencu Irina	R3	☐	■	Sef Departament, Control Intern Managerial Președintele Comitetului
Ec. Maria Tolbaru	Administrativ personal	■	☐	Director financiar
Liliana Zamfir	Administrativ personal	☐	■	Responsabil HR
Cristina Plești anu	Administrativ personal	☐	■	Manager de proiecte
Paul Claus	Administrativ personal	☐	■	Responsabil cu achiziții
Simona Manea	R2	■	☐	Din punct de vedere științific, reprezentantul departamentelor
Geanina Voicu	R2	☐	■	Din punct de vedere științific, reprezentantul departamentelor
Mirel Popa	R1	■	☐	Din punct de vedere științific, reprezentantul departamentelor
Razvan Macarie	R1	☐	■	Din punct de vedere științific, reprezentantul departamentelor

Organizația dvs. trebuie să-și consulte părțile interesate și să implice o comunitate reprezentativă de cercetători, de la R1 la R4 (https://euraxess.ec.europa.eu/europe/career-development/training-researchers/research-profiles-descriptors), precum și numirea unui Comitetul care supraveghează procesul și un grup de lucru responsabil pentru implementarea procesului HRS4R.

Furnizați informații despre modul în care grupurile de cercetători au fost implicate în analiza GAP:

Grupul de părți interesate	Consultare format	Contribuții
Comitetul Director și Grupul de Lucru	Față în față întâlnire	Pornind de la nevoia identificată de conducerea ICBP-NS de a alinia politicile UR cu cele ale principiilor Cartei și Codului European al Cercetătorului și pe baza aprobării cererii inițiale depuse pentru obținerea certificării HRS4R în cadrul Consiliului Științific, s-a luat decizia de demarare a procesului de elaborare a documentației necesare care urmează a fi depusă în faza inițială și în acest sens, stabilirea membrilor GT care să realizeze acest obiectiv în coordonarea CS, precum și a unei structuri de tip Taskforce de reprezentare. comunitate de cercetători (R1-R4) pentru colectarea datelor relevante, dezbateri pe diferite etape până la validarea rezultatelor procesului.
Grupul de lucru	Atelier	Analize privind nivelul de îndeplinire a celor 40 de principii ale C&C, a principalelor domenii de îmbunătățire pentru îndeplinirea acestora. A fost întocmit un prim document care a cuprins toate aceste aspecte.
Grupul de lucru și Grup de lucru pentru comunitate reprezentativă a cercetătorilor i validarea rezultate	Atelier	Elaborarea unui chestionar pentru un sondaj de opinie online, și anume interviuri față în față și focus grupuri.

Grupul de părți interesate	Consultare format	Contribuții
Grupul de lucru și Grup de lucru pentru comunitate reprezentativă a cercetători	Sondaj online și față în interviuri fata	Pentru a investiga opiniile cercetătorilor de la ICBP-NS cu privire la respectarea principiilor Cartei și Codului European al Cercetătorilor și măsurile propuse pentru ameliorarea decalajelor, a fost aplicată o strategie mixtă de consultare, constând în realizarea unui sondaj de opinie online. , respectiv interviuri față în față și focus grupuri. Chestionarul a fost autoadministrat online. Toți cercetătorii au primit un e-mail în care îi invita să-și exprime în mod anonim opiniile cu privire la implementarea principiilor C&C. Eșantionul final a inclus 54 de respondenți (o rată de răspuns de 57%). Datele au fost colectate în perioada august – septembrie 2023. Chestionarul a inclus patru secțiuni, corespunzătoare principiilor C&C. Răspunsul la fiecare item a fost înregistrat pe o scală Likert de 5 puncte, variind de la puternic dezacord la puternic de acord. Chestionarul a inclus și itemi socio-demografici și anume: sex, vârstă, vechime, titlul academic și domeniul de cercetare. Aceste date au fost folosite pentru a compara opiniile și nevoile diferitelor segmente de respondenți. Rezultatele chestionarului au fost integrate în analiza decalajului și sunt disponibile într-un Raport separat.
Grupul de lucru și Grup de lucru pentru comunitate reprezentativă de cercetători	Atelier	Analiza decalajelor realizată de membrii grupului de lucru sub coordonarea CS a fost dezbătută în cadrul unor ateliere interactive cu Taskforce, cu parcurgerea etapelor succesive de realizare a analizei decalajelor, a strategiei și a planului de acțiune. . Membrii grupului de lucru au fost invitați să-și exprime ideile și să formuleze recomandări pentru fiecare categorie de acțiuni menționate în planul de acțiune. Ca urmare a concluziilor obținute prin sondajul online, interviuri, focus grupuri și workshop-uri, analiza lacunelor, planul de acțiune propus inițial au fost revizuite și au fost sistematizate toate documentele pachetului pentru obținerea diplomei.

Vă rugăm să descrieți cum a fost numit și cum a funcționat Comitetul care supraveghează procesul (ședințe, decizii etc.):

Aplicarea strategiei HRS4R la ICBP-NS a fost identificată ca o prioritate în alinierea politicilor UR ale Institutului la practicile europene, în condițiile în care dezvoltarea proiectelor europene de cercetare este principalul mijloc prin care se pot realiza obiectivele de cercetare propuse la nivel instituțional. . Redactarea a 5 proiecte coordonate de directori străini, proiecte finanțate din fonduri de relocare și reziliență și câștigarea tuturor a reprezentat un imbold în demararea procedurilor de aliniere a practicilor de resurse umane ale Institutului la cele ale principiilor Cartei și ale Codul european al cercetătorului.

Implementarea efectivă a activităților HRS4R se va realiza sub coordonarea directorului ICBP-NS, doamna Maya Simionescu.

La selectarea membrilor Comitetului de Coordonare care va coordona procesul de implementare a HRS4R s-a considerat ca ambele departamente de cercetare ar trebui sa fie reprezentate de sefi de departamente care sunt si membri ai Consiliului Stiintific al ICBP-NS, cat si de coordonatorul compartimentul financiar-contabil, care cuprinde personalul administrativ al Institutului.

Pe tot parcursul procesului de elaborare a documentelor care corespund etapei inițiale a procesului HRS4R, membrii Comitetului Director au supravegheat activitatea GL și TF, au contribuit la formularea concluziilor și au aprobat documentația finală depusă.

Vă rugăm să descrieți cum a fost numit grupul de lucru care efectuează analiza decalajului:

La selectarea membrilor Comitetului director, Grupului de lucru și Grupului operativ, reprezentarea tuturor categoriilor de personal de cercetare din Institut, a cercetătorilor care ocupă funcții de conducere, dar și a cercetătorilor din categoriile R1-R4 care nu ocupă funcții de conducere, a cercetătorilor din toate categoriile de vârstă și reprezentarea bărbaților și femeilor, a personalului administrativ.

Grupul de lucru include cercetători superiori cu atribuții de conducere, membri ai Consiliului științific reprezentând organul de conducere al Institutului și reprezentanți ai personalului administrativ. Structura propusă de membri acoperă o întreagă zonă de expertiză relevantă pentru alinierea practicilor de resurse umane ale Institutului cu cele ale principiilor Cartei și Codului și utilizate de ICBP-NS pentru a parcurge procedura de implementare a Strategiei de resurse umane. pentru cercetători.

Grupul de lucru este coordonat de directorul adjunct al ICBP-NS Acad. Ileana Mânduțeanu și îi include pe șefii departamentelor de cercetare Anca Gafencu, Alexandrina Burlacu, Adrian Manea, Adriana Georgescu, Titorencu Irina, Voicu Geanina, Turtoiu Mihaela, șef RU Liliana Zamfir, Responsabil Achiziții Paul Claus, Cristina Plesoianu, manager proiecte europene.

Ținând cont de faptul că o astfel de abordare (procesul HRS4R) necesită obținerea consensului la nivelul instituției, dar și posibilitatea unor intervenții specifice la nivelul procedurilor interne, de exemplu, pentru a asigura acordul cu principiile Cartei și Cod, la constituirea celor două grupuri de lucru au fost avute în vedere următoarele criterii principale:

- angajarea liderilor instituției în acest proces. Conducerea instituției trebuie să aprobe oficial documentația, să participe la analiza lacunelor, la elaborarea Planului de acțiuni cunoașterea Planului strategic instituțional și a tuturor inițiativelor și reglementărilor (procedurilor)
- din domeniul politicilor de resurse umane, astfel încât în ele este integrat mecanismul Strategiei HRS4R. Strategia HRS4R trebuie să se refere la alte strategii existente și să contribuie la consolidarea cercetării în cadrul IBPC-NS implicarea cercetătorilor (personal academic) din toate etapele carierei (R1-R4, conform descriptorilor profilurilor de cercetare utilizați la nivel european).) în acest proces încă de la început.
- Anticiparea impactului acțiunilor preconizate, din perspectiva cercetătorilor, este foarte importantă la elaborarea Planului de acțiuni. Este esențial să se implice cei mai cunoscuți oameni, cu o bună cunoaștere a problemei și care doresc să participe activ la un astfel de proces, care își asumă responsabilitatea pentru una/unele acțiuni din Planul de acțiuni și care pot face propuneri viabile de îmbunătățire a aspectelor. raportat.

- Pentru o reprezentare a personalului de cercetare al Institutului a fost creat un Task Force format din 1 reprezentant al cercetătorilor R1, 2 reprezentanți ai cercetătorilor R2, 3 reprezentanți ai cercetătorilor R3, 1 reprezentant al cercetătorilor R1 (echilibrat de numărul de cercetători din Grupul de Lucru). Membrii grupului de lucru au avut o contribuție la conceperea chestionarului la care au răspuns 54 de cercetători dintr-un total de 88, la interpretarea datelor și la preluarea acestora în analiza Gap și ulterior la validarea concluziilor. care a dus la analiza.

- având experiență în analizarea unei acțiuni a Planului pe baza demonstrației impactului acelei acțiuni, util mai ales în etapa/etapele revizuirii acestuia
- cunoașterea legislației naționale și a reglementărilor instituționale în domeniul cercetării și educației, cu accent asupra resurselor umane.

HR Excellence in Research

Process Description

Process Description

Case number

2022RO843264

Name Organisation under review

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"

Organisation’s contact details

Bogdan Petriceicu Hasdeu, nr. 8 , BUCURESTI, 050568, Romania

Date endorsement charter and code

06/10/2022

Submission date to the European Commission

11/06/2024

Process

The HRS4R process must engage all management departments directly or indirectly responsible for researchers' HR-issues. These will typically include the Vice-Rector for Research, the Head of Personnel, and other administrative staff members. In addition, the HRS4R strategy must consult its stakeholders and involve a representative community of researchers ranging from R1 to R4 , as well as appoint a Committee overseeing the process and a Working Group responsible for implementing the process.

Please provide the name, the position and the management line/ department of the persons who are directly or indirectly engaged in the HRS4R process in your organisation:

Name	Position	Steering Committee	Working Group	Management line/ Department
Acad. Maya Simionescu	R4	■	☐	Director
Acad. Ileana Mânduțeanu	R4	☐	■	Deputy Director
Felicia Antohe	R4	■	☐	Secretary of Scientific Council
Anca SIMA	R4	■	☐	Chief Department
Manuela Calin	R4	■	☐	Chief Department
Anca Gafencu	R4	☐	■	Chief Department
Alexandrina Burlacu	R4	☐	■	Chief Department
Adrian Manea	R4	☐	■	Chief Department
Adriana Georgescu	R4	☐	■	Chief Department
Loredan St. Niculescu	R3	■	☐	Chief Department

Name	Position	Steering Committee	Working Group	Management line/ Department
Titorencu Irina	R3	☐	■	Chief Department, Internal Managerial Control Committee President
Ec. Maria Tolbaru	Administrative staff	■	☐	Financial Director
Liliana Zamfir	Administrative staff	☐	■	HR Responsible
Cristina Plești oianu	Administrative staff	☐	■	Projects manager
Paul Claus	Administrative staff	☐	■	Procurement responsible
Simona Manea	R2	■	☐	Scientifically Departments representative
Geanina Voicu	R2	☐	■	Scientifically Departments representative
Mirel Popa	R1	■	☐	Scientifically Departments representative
Razvan Macarie	R1	☐	■	Scientifically Departments representative

Your organisation must consult its stakeholders and involve a representative community of researchers ranging from R1 to R4 (https://euraxess.ec.europa.eu/europe/career-development/training-researchers/research-profiles-descriptors), as well as appoint a Committee overseeing the process and a Working Group responsible for the implementation of the HRS4R process.

Provide information on how the researchers groups were involved in the GAP-analysis:

Stakeholder group	Consultation format	Contributions
Steering Committee and Working Group	Face to face meeting	Starting from the need identified by the ICBP-NS management to align RU policies with those of the principles of the Charter and the European Code of Researcher and based on the approval of the initial application submitted to obtain the HRS4R certification within the Scientific Council, the decision was taken to start the elaboration process of the necessary documentation to be submitted in the initial phase and in this, sense of establishing the members of the WG to carry out this objective in SC coordination, as well as of a Taskforce type structure for representative community of researchers (R1-R4) for relevant data gathering, debates on different stages until the validation of the process results.
Working Group	Workshop	Analyzes regarding the level of fulfillment of the 40 principles of C&C, of the main areas of improvement for their fulfillment. A first document was drafted that contained all these aspects.
Working Group and Taskforce for representative community of researchers and validation of the results	Workshop	Developing a questionnaire for an online opinion poll, namely face-to-face interviews and focus groups.

Stakeholder group	Consultation format	Contributions
Working Group and Taskforce for representative community of researchers	Online survey and face-to-face interviews	In order to investigate the opinions of researchers from ICBP-NS regarding compliance with the principles of the Charter and the European Code of Researchers and the measures proposed to improve the gaps, a mixed strategy of consultation was applied, consisting of conducting an online opinion survey, respectively face-to-face interviews and focus groups. The questionnaire was self-administered online. All researchers received an email inviting them to anonymously express their views on the implementation of the C&C principles. The final sample included 54 respondents (a response rate of 57%). The data were collected between August and September 2023. The questionnaire included four sections, corresponding to C&C principles. The response to each item was recorded on a 5-point Likert scale, ranging from strongly disagree to strongly agree. The questionnaire also included socio-demographic items, namely: gender, age, seniority, academic title and field of research. This data was used to compare the views and needs of different segments of respondents. The results of the questionnaire were integrated into the gap analysis and are available in a separate Report.
Working Group and Taskforce for representative community of researchers	Workshop	The gap analysis carried out by the members of the working group under the coordination of the SC was debated in some interactive workshops with the Taskforce, with the completion of successive stages for the realization of the analysis of the gaps, the strategy and the action plan. Taskforce members were invited to express their ideas and formulate recommendations for each category of actions mentioned in the action plan. As a result of the conclusions obtained through the online survey, interviews, focus groups and workshops, the analysis of the gaps, the initially proposed action plan were revised and all the documents of the package for obtaining the diploma were also systematized.

Please describe how the Committee overseeing the process was appointed and how it worked (meetings, decisions, etc.):

The application of the HRS4R strategy at ICBP-NS was identified as a priority in aligning the Institute's RU policies with European practices, given that the development of European research projects is the main means by which the research objectives proposed at the institutional level can be achieved. The writing of 5 projects coordinated by foreign directors, projects financed from resettlement and resilience funds and the winning of all of them represented an impetus in starting the procedures for aligning the human resources practices of the Institute with those of the principles of the Charter and the European Code of Researcher.

The effective implementation of the HRS4R activities will be carried out under the coordination of the ICBP-NS director, Mrs. Maya Simionescu.

When selecting the members of the Steering Committee that will coordinate the HRS4R implementation process, it was considered that both the research departments should be represented by heads of departments who are also members of the Scientific Council of ICBP-NS, as well as the coordinator of the financial-accounting department, which includes the administrative staff of the Institute.

Throughout the process of developing the documents that correspond to the initial stage of the HRS4R process, the members of the Steering Committee supervised the activity of the WG and TF, contributed to the formulation of the conclusions and approved the final submitted documentation.

Please describe how the Working Group doing the Gap Analysis was appointed:

When selecting the members of the Steering Committee, Working Group and Task Force, the representation of all categories of research staff in the Institute, of researchers who hold management positions, but also of researchers from categories R1-R4 who do not hold management positions, of researchers from all age categories and the representation of men and women, of the administrative staff.

The **working group** includes senior researchers with management attributions, members of the Scientific Council representing the governing body of the Institute and representatives of the administrative staff. The proposed structure of members covers an entire area of expertise relevant to the alignment of the Institute's human resources practices with those of the principles of the Charter and the Code and used by the ICBP-NS to go through the procedure of implementing the Human Resources Strategy for researchers.

The working group is coordinated by the deputy director of ICBP-NS Acad. Ileana Mânduțeanu and includes the heads of research departments Anca Gafencu, Alexandrina Burlacu, Adrian Manea, Adriana Georgescu, Titorencu Irina, Voicu Geanina, Turtoiu Mihaela, head of RU Liliana Zamfir, Procurement Responsible Paul Claus, Cristina Plesoianu, manager of European projects.

Taking into account the fact that such an approach (the HRS4R process) requires obtaining consensus at the level of the institution, but also the possibility of specific interventions at the level of internal procedures, for example, to ensure agreement with the principles of the Charter and the Code, when establishing **the two working groups were considered the following main criteria:**

- **engaging the leaders of the institution in this process**. The management of the institution must officially approve the documentation, participate in the analysis of the gaps, in the development of the Action Plan
- **knowledge of the Institutional Strategic Plan and all initiatives and regulations (procedures) in the field of human resources policies**, so that the mechanism of the HRS4R Strategy is integrated into them. The HRS4R strategy must refer to other existing strategies and contribute to the consolidation of research within the IBPC-NS
- **the involvement of researchers (academic staff) from all career stages** (R1-R4, according to the descriptors of research profiles used at the European level) in this process from the very beginning. Anticipating the impact of the intended actions, from the researchers' perspective, is very important when developing the Action Plan. It is essential to involve the most knowledgeable people, with a good knowledge of the issue and who want to actively participate in such a process, who take responsibility for one/some actions from the Action Plan and who can make viable proposals for improving the aspects reported.
- For a representation of the Institute's research staff, a **Task Force** was created consisting of 1 representative of R1 researchers, 2 representatives of R2 researchers, 3 representatives of R3 researchers, 1 representative of R1 researchers (balanced by no. of researchers from the Working Group. Members of the Task force have had a contribution to the design of the questionnaire to which 54 researchers out of a total of 88 answered, to the interpretation of the data and to their taking over in Gap analysis and later to the validation of the conclusions that resulted in the analysis.

- **having experience in analyzing an action of the Plan based on the demonstration of the impact of that action**, especially useful in the stage/stages of its review
- **knowledge of national legislation and institutional regulations in the field of research and education**, with an emphasis on human resources.

Excelența HR în cercetare

Analiza GAP (listă de verificare pentru charter și cod)

Analiza GAP (listă de verificare pentru charter și cod)

Numărul cazului2022RO843264

Nume Organizație în curs de revizuire

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

Datele de contact ale organizației

Bogdan Petriceicu Hasdeu, nr. 8 , BUCURESTI, 050568, Romania

Data și codul de aprobare

06.10.2022

Data depunerii la Comisia Europeană

Prezentare generală a analizei GAP

Carta și Codul oferă baza pentru analiza Gap. Pentru a sprijini coeziunea, cele 40 de articole au fost renumerotate la următoarele titluri. Vă rugăm să furnizați mai jos rezultatul analizei GAP a organizației dvs. Dacă organizația dvs. nu îndeplinește în prezent criteriile pe deplin, vă rugăm să enumerați dacă legislația națională sau organizațională poate limita implementarea Cartei, inițiative care au fost deja luate pentru a îmbunătăți situația sau noi propuneri care ar putea remedia situația actuală. Pentru a ajuta strategia de recrutare a organizației, este oferităo listă de verificare de autoevaluare specifică pentru recrutarea deschisă, transparentă și bazată pe merit.

Carta europeană a cercetătorilor și codul de conduită pentru recrutarea cercetătorilor: analiza GAP

Prezentare generală

- Statut : în ce măsură această organizație îndeplinește următoarele principii?
- Implementare (++ , +/- , -/+, --) :
  - ++ implementat complet
  - +/- aproape, dar nu complet implementat
  - -/+ implementat parțial
  - -- implementat insuficient
- GAP : În cazul --, -/+ sau +/-, vă rugăm să indicați „decalajul” real dintre principiu și practica curentă din organizația dumneavoastră.
- Obstacole în implementare : Dacă este relevant, vă rugăm să enumerați orice legislație națională/regională sau reglementare organizațională care împiedică implementarea în prezent.
- Inițiative întreprinse/propuneri noi : Dacă este relevant, vă rugăm să enumerați orice inițiative care au fost deja luate pentru a îmbunătăți situația și/sau noi propuneri care ar putea remedia situația actuală.

stare
Aspecte etice și profesionale

1. Cercetează libertatea

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/nou propuneri
	- Lipsa finanțării pentru accesul la toate publicațiile, consumabilele necesare pentru a efectua cercetări. - Legislație și proceduri greoaie în materie de achiziții. - Finanțare insuficientă pentru tineri la începutul carierei - Managementul și practicile specifice activităților de cercetare nu sunt reuniteîntr-un cadru unificat și nu sunt diseminate pe scară largă pentru a permite orientării, în primul rând tinerilor cercetători, să devină confortabil încă de la începutul carierele lor cu înțelegerea și abordarea corectă a libertății de cercetare.	Stabiliți un spațiu dedicat pe site-ul ICBP-NS, secțiunea Cercetare, cu informații relevante despre mijloacelerealizate disponibile de ICBP-NS pentru aasigura libertă i i oportunități pentru activitatea de cercetare.
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	Legislația națională/regională sau reglementarea organizatorică în prezentîmpiedică implementarea - Legea nr. 98/2016 privind achizițiile publice care nu oferă flexibilitate pentru personalizarea tipului de consumabilenecesare în funcție de rezultatele cercetării la diferite etape; - Legea bugetului de stat care alocă Academiei Române un buget pentru toate institutele de cercetare din subordine, inclusiv ICBP-NS. Bugetul alocat este în mare partepentru cheltuielile salariale și doar într-o mică măsură pentru nevoile de modernizare a echipamentelor, întreținere și cercetare consumabile.	Organizarea de sesiuni de formare în etica cercetării pentru doctorat studenți și tineri cercetători atunci când încep să lucreze în Institut. Propuneri legislative pentru asigurarea flexibilitățiiachizițiilor publice în cercetare.

2. Principii etice

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	- Codul de etică conține elemente care trebuie să fie actualizat în conformitate cu ediția din 2023 a Codului europeande conduită pentru integritate în cercetare, inclusiv elemente legate de integritate. - Deși documentele privind principiile de etică și conduită profesională sunt diseminate la nivelul ICBP-NS, comunicarea trebuie îmbunătățită pentru a crește gradul de conștientizare și înțelegere a acestora și aprincipiilor Codului European de Conduită.	Adăugarea de elemente legate de integritate la Codul deetică pentru a promova statutul moral pe care ar trebui să-l aibă cercetătorii (onestitate, corectitudine și demnitate). Organizați cursuri obligatorii de etică și integritate. Stabiliți un spațiu dedicat pe site-ul ICBP-NS, secțiunea Cercetare, cu informații relevante despre cum să aplicați principiile etice și munca.

3. Responsabilitate profesională

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
-/+ implementat parțial	Cel socio-economic aspectele de responsabilitate ale activității de cercetare sunt insuficient dezvoltate în documentele interne cu care ICBP-NS funcționează, de asemenea, insuficient monitorizat și diseminat către personalul de cercetare.	Actualizarea procedurilor pentru activități de cercetare, inovare pentrua clarifica/evidenția responsabilitățile cercetătorului în ceea ce privește eficiența costurilor în raport cu rezultatele. Dezvoltați proceduri și organizați sesiuni de formare pentru a crește gradul de conștientizare a personalului cu privire la responsabilitatea socială și economică Extinderea accesului la bazele dedate științifice pentru a include publicații de mare impact. Dezvoltarea platformeielectronice ICBP-NS cu facilități dedicate combaterii plagiatului și autoplagiatului.Consiliul științific va atribui membrilor responsabilități precise pentru îndrumarea și monitorizarea integrării tinerilor în activitatea Institutului.

4. Atitudine profesională

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	- Deși există proceduri la nivel instituțional de gestionare a procesului de cercetare la nivel de substructură, există proiecte în care este nevoiede implicarea mai multor departamente plus sprijinul departamentelor administrative. Astfel, este necesar să existe o procedură de implementare a proiectelor, cuplată cu necesitatea de a informa în permanență cercetătorii cu privire la responsabilitățile lor pentru implementarea unui proiect, și pentru exploatarea rezultatelor cercetării în beneficiul societății. - Monitorizareaimplementarii paralele a mai multor proiecte supuse reglementarilor specifice liniilor de finantare accesate este dificil de realizat in lipsa unui instrument electronic de management al proiectelor. Legislația națională/regională sau reglementarea organizatorică în prezent împiedică implementarea - reglementările legale referitoare la mecanismele de finanțare a proiectelor finanțate prin grant nu sunt întotdeauna respectate, ceea ce duce la blocaje de numerar necesare atingerii obiectivelor asumate în contractele de finanțare. -Legea nr. 98/2016 privind achizițiile publice care nu oferă flexibilitate pentru personalizarea tipului de consumabile necesare în funcție de rezultatele cercetării în diferite etape	Stabiliți un spațiu dedicat pe site-ul ICBP-NS, secțiunea Cercetare, cu informații relevante despre pașii de urmat în procesul de identificare aoportunităților de cercetare. Implementarea unei proceduri de implementare a unui proiect, cuplată cu nevoia de a informa în permanență cercetătorii cu privire la responsabilitățile lor în implementarea unui proiect și de a exploata rezultatele cercetării în beneficiul societății. Creați un sistem electronic de management al proiectelor/programelor care poate fi accesat pe intranet și care oferă informații permanente despre disponibilitatea resurselor (umane, financiare, materiale), termene pentru livrabile, etape.

5. Obligații contractuale și legale

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	- Contractele de munca nu fac referire la know-how-ul creat la nivel al Institutului i păr ilor care l-au înființ at. Prevederile privind know-how-ul sunt prevăzute doar încontractele de grant. - Problemele de proprietate intelectuală sunt aduse la cunoștință doar de cercetători în activită i care au ca rezultat publicații, brevete. - Nu există îndrumări interne cuprivire la reglementările interne referitoare la implicațiile/obligațiile cercetătorului/instituției/ finanțatorului cu privire la rezultatele obținute în contextul diferitelor tipuri de contracte de finanțare/servicii pentru cercetareși activități de inovare	Includerea problemelor de know-how și de proprietate intelectuală în fișele postului Elaborarea unui ghid intern privind reglementările interne privind implicațiile/obligațiile cercetătorului/ instituției/finanțatorului asupra rezultatelor obținute în contextul diferitelor tipuri de contracte de finanțare/servicii pentru activități de cercetare și inovare. Implementarea unei proceduri de implementare a unui proiect, cuplată cu nevoia de a informa în permanență cercetătorii cu privire la responsabilitățile lor în implementarea unui proiect și de a exploata rezultatele cercetării în beneficiul societății. Crearea unui spațiu dedicat pesite-ul ICBP-NS, secțiunea Cercetare, cu informații relevante despre pașii de urmat în procesul de cercetare finalizat prin obținerea de rezultate care implică drepturi de proprietate intelectuală.

6. Responsabilitate

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
-- insuficient implementat...	- Conștientizarea insuficientă a personalului ale socio-economice responsabilitate - informațiile financiare publice nu sunt actualizat pe pagina web existentă, acesta va fi inclus în versiunea actualizată în curs de producere.	Crearea unui sistem electronic de management al proiectelor/programelor, cu o componentă de urmărire a rezultatelor cercetării și o componentă legată de transparențași eficiența resurselor financiare. Managementul și practicile specifice activităților de cercetare, împreună cu managementul financiar transparent și eficient, se recomandă să fie reunite într-un cadru unitar - PO de sistem - și să fie diseminate pe scară largă. Actualizarea procedurilor de cercetare, activități de inovare pentru a clarifica/ evidențiază responsabilitățile cercetătorului în ceea ce privește eficiența costurilor în raport cu rezultatele. Organizarea de sesiuni de informare pentru a sensibilizapersonalul cu privire la aspectele socio-economice; responsabilitate. Actualizați site-ul proiectului cu o secțiune specială dedicată transparenței financiare.

7. Bună practică în cercetare

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	- nu există Protecție Generală a Datelor Reglementare - GDPR - nu există un sistem de rezervă pentru stocarea informațiilor/datelor de cercetare. - sistem de backup învechit pentru stocarea informațiilor/datelor de cercetare. - Sistemele de protecțiea datelor trebuie să fie actualizate, deoarece întreaga platformă de date de cercetare este actualizată ca structură.	Elaborarea unui Regulament General de Protecție a Datelor - GDPR pentru transpunerea prevederilor legale la nivelul Institutului. Organizarea sesiunilor de instruire privind condițiile de securitate a muncii și prevenirea riscurilor existente va fi înregistrată și publicată pe site-ul ICBP-NS Raportanual privind evoluția procesului de management al riscurilor. sistem de stocare și stocare actualizat a informațiilor/datelor, inclusiv sisteme de protecție și securitate a datelor

8. Diseminarea, exploatarea rezultatelor

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
-/+ implementat parțial	- Site-ul web ICBP-NS nu are un interfață ușor de utilizat, cu informații învechite și fără o platformă care să conțină date structurate în ceea ce privește domeniile de cercetare abordate. - Acolo nu există un plan de comunicare integrat pentru diseminarea rezultatelor cercetării efectuate la Institut. - Nu afilieri la cercetarea internațională rețele/ huburi de inovare	Dezvoltarea unui plan de comunicare, identificarea mijloacelor și a grupurilor țintă pentru a maximiza exploatarea rezultatelor cercetării Încurajarea stabilirii de parteneriate pentru integrarea IBPC-NS în clustere de inovare și hub-uri/ rețele tematice pentru a îmbunătăți exploatarea rezultatelor cercetării. Actualizarea și dezvoltarea site-ului IBPC-NS: - structurat, clar, cu informații importante și detaliate despre activitate, istorie și planuri prezente și viitoare, astfel încât viziunea IBPC-NS să fie transparentă pentru vizitatori; - reorganizarea informației științifice într-o platformă modernă de cercetare - Crearea unui spațiu dedicat pe site-ul IBPC-NS, în cadrul secțiunii Cercetare, pentru diseminarea și exploatarea rezultatele cercetării

9. Implicarea publicului

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
-/+ implementat parțial	- Nu există un plan de comunicare integrat pentru diseminarea rezultatelor cercetării efectuate la Institutul. - Site-ul web ICBP-NS nu are un interfață ușor de utilizat, cu informații învechite și fără o platformă care să conțină date structurate în ceea ce privește domeniile de cercetare abordate.	Dezvoltarea unui spațiu dedicat pe site-ul ICBP-NS, pentru expunerea rezultatelor/ideilor cercetării prin monitorizarea periodică a progresului cercetării aplicate și informarea publicului de specialitate în toate etapele cercetare.

10. Nediscriminare

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/nou propuneri
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	- Procedurile nu sunt actualizate cu privire la criteriile de gen.	Actualizare privind procedurile privind criteriile de gen.

11. Sisteme de evaluare/apreciere

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	- Sistem de evaluare parțial funcțional pentru personalul de cercetare	Actualizarea procedurii interne de evaluare a performanței personalului. Stabiliți un sistem de îmbunătățire a performanței utilizând metode/mijloace moderne.

Recrutare și selecție - vă rugăm să rețineți că elementele enumerate aici corespund cu Carta și Codul. În plus, organizația dvs. trebuie să completeze și lista de verificare privind recrutarea deschisă, transparentă și bazată pe merit inclusă într-o secțiune separată, care se concentrează pe operaționalizarea acestor principii.

12. Recrutare

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
-/+ implementat parțial	- Procesul de recrutare este condiționat de aprobarea posturilor din schema de personal și a alocărilor bugetarepentru posturile permanente. - Politica de recrutare deschisă, transparentă și bazată pe merit nu este finalizată și publicată pe site-ul ICBP-NS - Chiar dacă principiile politicii de recrutare deschise, transparente și bazate pe merit sunt incluse în mare parte în procedurileși practicile de recrutare, promovare, selecție pentru toți tipuri de posturi specifice posturilor din ICBP-NS, sunt necesare reformulări pentru a fi pe deplin în conformitate cu cerințele OTM-R. - Este necesară îndeplinirea unor sarcini administrative ale Direcției Resurse Umane corespunzătoare unor cerințe ale OTM-R. Legislația națională/regională sau reglementarea organizatorică în prezent împiedică implementarea Legii bugetului de stat care alocă Academiei Române un buget pentru toate institutele de cercetare din subordine, inclusivICBP-NS. Bugetul alocat este destinat în principal cheltuielilor salariale atâta timp cât posturile din organigramă sunt aprobate și nu sunt blocate de restricții bugetare.	- Consolidarea strategiei și procedurilor existente într-un document privind Politica OTM-R - Publicarea Politicii OTM-R pe site-ul ICBP-NS - Elaborareaghidului intern care stabilește proceduri și practici OTM-R clare pentru toate tipurile de posturi - Training sesiuni pentru prevederile politicii OTM-R. - Statistica prezenței la cursurile de formare OTM-R se va face separat - Actualizarea Metodologiei ICBP-NS pentru ocuparea posturilorvacante de cercetare, pentru respectarea deplină a politicilor OTM-R - Finalizarea sarcinilor administrative ale Departamentului Resurse Umane pentru implementarea cerințelor obligatorii al OTM-R.

stare

13. Recrutare (Cod)

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	- Este nevoie de creșterea vizibilității posturilor vacante pentru cercetători pe ICBP-site-ul NS. - Chiar dacă reclamele sunt publicate în toate mediile online specifice cercetării, este adesea necesară republicarea reclamelor, îngreunând recrutarea candidaților. - Reclamele fac nu descriu în detaliu condițiile de muncăși perspectivele de dezvoltare a carierei.	Dezvoltarea unui set de instrumente pentru aplicații online pe site-ul web IBPC-NS. Organizarea de evenimente precum ICBP-NS Open Doors și trimiterea de materiale informative despre oportunitățile de dezvoltarea carierei în cadrul ICBP-NS pentru studenții în ultimii ani la facultățile relevante. Participarea la conferințele Academiei Române, precum și la alte evenimente academice și târguri de locuri de muncă dedicate cercetătorilor, inclusiv la nivel european pentrupopularizarea activităților Institutului și atragerea tinerilor. Completarea reclamelor cu informații despre condițiilede muncă și perspectivele de dezvoltare a carierei

14. Selectare (Cod)

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	- Pentru conditiile specifice posturilor din afara organigramei, concursuri organizate pe posturi incluse in cadrul proiectelor nerambursabile, nu se organizeaza in prealabil training pentru membrii Comisiei. - În componența comisiilor de evaluare rareori sunt incluse experți din afara Academiei Române și din sectorul privat, având în vedere natura activității de cercetare ICBP-NS, adică de bază; cercetare.	Organizarea de sesiuni preliminare de instruirepentru membrii Comitetului de Evaluare pentru recrutarea personalului de cercetare neorganizatoric. Includerea experților în sănătate în Comisiile de evaluare ca finală beneficiarii rezultatelor cercetăriirealizat de ICBP-NS.

15. Transparență (Cod)

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	Nu sunt specificate în detaliu în textul reclamei oportunitățile profesionale și de dezvoltare a carierei pe care ICBP-NS le poate oferi.	Completarea reclamelor cu informații despre condițiile de muncă și perspectivele de dezvoltare acarierei

16. Meritul de judecată (Cod)

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
-/+ implementat parțial	Criteriile actuale nu includ probleme legate de strângerea de fonduri, socio-economice responsabilitate, managementul cercetării.	Includeți în procedura de selecție, unde adecvate, criterii legate de strângerea de fonduri, responsabilitate socio-economică, managementul cercetării.

17. Variații în ordinea cronologică a CV-urilor (Cod)

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	procedura ICBP-NS de umplere permanentă sau posturi temporare de cercetare vacante în interior sau în exterior organigrama nu con ine un distinctreferire la problema variațiilor din CV cronologie	Procedura ICBP-NS pentru completarea cercetărilor vacante posturi, permanente sau temporare, în interior sau în exterior organigrama se va completa cu referire separată la aspectul variațiilor în Cronologia CV-ului.

18. Recunoașterea experienței de mobilitate (Cod)

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
-/+ implementat parțial	Procedura ICBP-NS de umplere permanentă sau posturi temporare de cercetare vacante în interior sau în exterior organigrama nu contine a referire separată la experiența de mobilitate.	Procedura ICBP-NS pentru completarea cercetărilor vacante posturi, permanente sau temporare, în interiorul sau în afara organigrama se va completa cu un separat referire la aspectul experienței de mobilitate.

19. Recunoașterea calificărilor (Cod)

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	procedura ICBP-NS pentru ocuparea posturilor vacante permanente sau temporare de cercetareîn cadrul sau în afara organigramei nu conține o referire distinctă la recunoașterea calificărilor profesionale formale și non-formale.	Procedura ICBP-NS de ocupare a posturilor de cercetare vacante, permanente sau temporare, în cadrul sau în afara organigramei va fi completată cu oreferire separată la criteriul legat de recunoașterea calificărilor profesionale formale și non-formale.

20. Vechime (Cod)

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	Chestionarele pentru proba scrisă nu includ aspectelegate de viziunea candidatului asupra dezvoltare profesională.	Includerea în chestionarul de probă scrisă aaspectelor legate de viziunea candidatului asupra dezvoltării profesionale.

21. Programări postdoctorale (Cod)

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	- Datorită finanțării din diferite surse (proiecte, programe, burse) nu există criterii uniforme de selecție a personalului postdoctoral. -Nu există condiții pentru stabilirea duratei maxime de numire/activitate într-un astfel de post, cu excepția celor stabilite prin programe/proiecte.	Dezvoltați programe de mobilitate pentru cercetare și dezvoltare și inovare și/sau alte abilitățicomplementare pentru tinerii cercetători la nivel postdoctoral. Organizarea unui Club de Tineri Cercetători care să fie un vehicul de integrare a acestora în echipele de cercetare ICBP-NS, pentru a facilita participarea la mobilități, la evenimente precum Bursa Idei Tineri Cercetători, Bursa Nicolae Simionescu.

Conditii de munca si securitate sociala

22. Recunoașterea profesiei

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/nou propuneri
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	- Evaluarea performanței cercetătorilor se face într-un mod tradițional, fără a se asigura o transparență deplină, ceea ce duce la evaluări subiective ale părțilorinteresate.	Actualizarea sistemului de evaluarea performanțelor pentru toate nivelurile profesionale.

23. Mediu de cercetare

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	- Deși managementul și practicile specifice activităților de cercetare sunt bine organizate, acestea nu sunt diseminate pe scară largă pentru a permite tinerilor cercetători în specialsă fie îndrumați, încă de la începutul carierei, să se familiarizeze cu înțelegerea și abordarea corectă a libertății de cercetare. - Infrastructura ICBP-NS trebuie actualizată parțial prin proiecte în derulare care nu acoperă în totalitate nevoile identificate - Deși condițiile de lucru la distanță sunt reglementate pentru activitățile de CDI, inclusiv pentru studenții doctoranzi și cercetătorii cu fracțiune de normă (contracte de muncă pe durată determinată), nu există facilități de internet și pentru acest tip de activități.	Elaborarea și implementarea reglementărilor interneprivind condițiile de lucru la distanță și dezvoltarea capacității instituționale de informare pentru lucrul ladistanță. Stabiliți un spațiu dedicat pe site-ul web al ICBP-NS, secțiunea Cercetare, cu informații relevantedespre mijloacele puse la dispoziție de ICBP-NS pentru a asigura libertăți și oportunități pentru activitatea de cercetare. Extinderea accesului la bazele de date științificepentru a include publicații de mare impact. Dezvoltarea facilităților intranet la distanță.

24. Conditii de munca

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	Mai multe beneficii pot fi implementate pentru angajații ICBP-NS pentru a face locul de muncă mai atractiv și pentru a crește creativitatea și dorința de a dedica mai multe resurse cercetării, de exemplu: - Inclusiv lucrul la distanță - Sabatic etc.	Dezvoltarea și implementarea procedurilor privind condițiile de telemuncă/ consolidarea capacităților pentru telemuncă și munca la domiciliu.

25. Stabilitatea și permanența locului de muncă

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprins/nou propuneri
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	- Lipsa unei proceduri de lucru hibrid de la distanță Legislația națională/regionalăsau reglementarea organizațională care împiedică implementarea în prezent Codul Muncii, limitând încheierea a mai mult de 3 contracte succesive de muncă pe durată determinată	Dezvoltați o procedură de lucru hibridă și de la distanță.

26. Finanțare și salarii

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/noupropuneri
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	ICBP-NS trebuie să actualizeze Comitetul de Control Intern al Managementuluiastfel încât să poată monitoriza îndeaproape evoluția cercetătorilor și să identifice cât mai curând posibil erorile care apar în ceea ce privește salarizarea angajaților, astfel încât să nu existe discrepanțe nejustificate între cei care au aceeași poziție și găsiți cele mai avantajoase soluții pentrua crea cele mai avantajoase oferte pentru a stimula tinerii cercetători.	Actualizarea procedurilor, reglementărilor astfel încât acestea să răspundă mai mult la nevoile cercetătorilor de la Institut, pentru a seasigura că erorile sunt evitate și pentru a oferă cele mai avantajoase condi ii pentru stimularea tinerilor cercetători.

27. Echilibrul de gen

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
++ implementat complet		

28. Dezvoltarea carierei

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	- Participarea la activități de formare continuă este decis în mod individual și nu face parte dintr-un strategie de formare aplicabilă Institutului ca a întreg. - Evaluarea progresului este asigurată de metode tradi ionale care nu corespund mijloace moderne de feedback	Dezvoltarea unei dezvoltări cuprinzătoare a carierei politica pentru a oferi cadrul metodologic pentru organizarea muncii cercetătorilor pentru carieră progres Dezvoltarea unui sistem de feedback pentru evaluarea și revizuirea progresului cercetătorilor în stadiu incipient.

29. Valoarea mobilității

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	- Este nevoie de mai mult strategie eficientă de mobilitate care să cuprindă nevoile și sursele de finanțare ale tuturor cercetătorilor pentru mobilitate - Lipsa reglementării mobilității în ROF ICBP-NS	Actualizarea regulilor interne ale ICBP-NS privind mobilitatea personalului Elaborarea unei strategii de mobilitate mai eficace care să cuprindă toate nevoile cercetătorilor, ajutându-i să se dezvolte în cariera șisă-și maximizeze dezvoltarea cercetării prin crearea celor mai avantajoaseoportunități. Strategia trebuie să includă toate sursele de finanțare și să reglementeze acordurile de colaborare cu instituții naționale și internaționale prestigioase, precum și implementarea unor programe de schimb mai complexe.

30. Acces la consiliere în carieră

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/nou propuneri
-/+ implementat parțial	- Nu există prevederi pentru elaborarea unui plan de carieră, care devine efectiv după angajare, pentru ocuparea unui post de cercetaresau pentru avansarea în carieră.	Incheierea de parteneriate cu părțile interesate din industrie pentru plasareaforței de muncă

31. Drepturi de proprietate intelectuală

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	Nu există un mecanism de recompensare financiară pentru cercetătorii inventatori, dar munca lor este recunoscută în rapoartele anuale de activitate șieste susținută participarea la evenimentele organizate în țară sau în străinătate.	Formare cu cercetători juniori, în domeniul protecției și exploatăriidrepturilor de proprietate intelectuală, în sistemul de „formare a formatorilor” la nivel de departament Crearea unui spațiu dedicat pe site-ul web al ICBP-NS privind protecția și exploatarea drepturilor deproprietate intelectuală

32. Coautoratul

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprins/nou propuneri
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	Nu există sesiuni de instruire privind coautoratul la nivelul IBPC-NS care să specifice modulîn care se determină contribuția reală a fiecărui participant la un rezultat al cercetării și contribuția reală ca co-autor al unei lucrări științifice, astfel încât fiecaresă poată beneficiaza de dreptul de a fi recunoscut si/sau citat si citat, in functie de amploarea contributiei sale efective, corect determinata.	Instruire în aplicarea unei proceduri de co-autorat la nivelul ICBP-NS

33. Predare

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
++ implementat complet		

34. Reclamații/ contestații

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	Comitetele și structurile administrative care pot să fie implicat în diverse tipuri de conflicte/plângeri care apar în rândul personalului ICBP-NS nu sunt popularizate intern.	Faceți publicitate intern, prin intermediul intranetului, a comitete/structuri și regulamente/instrucțiuni privind sarcinile lor

35. Participarea la organele de decizie

Implementarea	GAP / Implementare impedimente	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	Rezultatele muncii de decizie-realizarea organelor, consultarea comitete/organisme, informații sunt nepopularizat în cadrul ICBP-NS comunitate.	Dezvoltați intern, prin intranet, o secțiune dedicată publicarea activităților comitetelor/conducerii structurile și deciziile acestora de interes public, structurate de domeniile operaționale ale Institutului: educație, cercetare, inovare, resurse umane, capacitate administrativă.

Antrenament și dezvoltare

36. Relația cu supraveghetorii

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
-/+ implementat parțial	- ICBP-NS nu a elaborat o politică de dezvoltare a cariereicare să menționeze un parcurs de formare adaptat nivelului de carieră și să propună o abordare strategică aactivităților de mentorat și supraveghere. Legislația națională/regională sau regulamentul organizatoric care împiedică în prezent implementarea CG nr. 57/2002 lipsa cadrului de implementare a activitatilor de supervizare pentrupostdoctorati, asistenti si lectori	Reunirea tuturor resurselor care se ocupă de formare și dezvoltare profesională pentru a include sarcini multidimensionale de management al carierei, inclusiv asistarea tinerilor cercetători de la admitere, mentorat, urmărirea progresului și a rezultatelor cercetării, consiliere pentru dezvoltarea carierei. Organizarea de webinarii periodice dedicate tinerilor cercetători pentru a actualiza progresul științific în domenii specifice ale cunoa terea activită ii de cercetare desfă urată la nivelul tuturor departamentelorICBP-NS.

37. Supraveghere și sarcini manageriale

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/nou propuneri
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	Activitățile de supraveghere nu se desfășoară sistematic în absența unui cadru care să reglementeze activitatea supervizorului și a mentoratului Legislația națională/regională sau regulamentul organizațional care împiedică în prezent implementarea OG nr. 57/2002 lipsa cadrului pentru implementarea activitatilorde supervizare pentru postdoctorati, asistenti si lectori	Dezvoltarea unei strategii de mentorat și supraveghere a carierei pentru a consolida poziția mentorilor. Organizarea de programe de formare pentru mentori și dezvoltatori de leadership

38. Dezvoltare profesională continuă

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
-/+ implementat parțial	- Participarea la activități de formare continuă se decide individualși nu face parte dintr-o strategie de formare aplicabilă Institutului în ansamblu. - Nu există un cadru metodologic pentru organizarea muncii cercetătorilor care să îi sprijine în dezvoltarea carierei. - Nu există prevederi pentru elaborarea unui plan de carieră, care devine efectiv după angajare, pentru ocuparea unui post de cercetare sau pentru avansarea în carieră.	Dezvoltarea unei politici cuprinzătoarede dezvoltare a carierei care să ofere cadrul metodologic pentru organizarea muncii cercetătorilor pentru avansarea în carieră Dezvoltarea de programe de formare specifice carierei, inclusiv instrumente de planificare a carierei.

39. Accesul la formare în cercetare și dezvoltare continuă

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
-/+ implementat parțial	- Participarea la activități de formare continuă se decide individual și nu face parte dintr-o strategie de formare aplicabilă Institutului în ansamblu. - Deși ICBP-NS desfășoară programe de formare continuă, acesteaau ca scop doar într-o mică măsură îmbunătățirea capacității de angajare.	Dezvoltarea unei politici cuprinzătoare de dezvoltare a careereicare să ofere cadrul metodologic pentru organizarea muncii cercetătorilor pentru avansarea în carieră Organizarea de programe interdisciplinare care vizează îmbunătățirea capacității de angajare prin dezvoltarea abilitățilorși competențelor tinerilor cercetători

40. Supraveghere

Implementarea	GAP / impedimente de implementare	Inițiative întreprinse/propuneri noi
+/- aproape dar nu pe deplin eu...	Evaluarea progresului este asigurată de tradițional metode care nu corespund mijloacelor moderne de feedback	Dezvoltarea unui sistem de feedback pentru evaluarea și revizuirea progresului cercetătorilor înstadiu incipient.

HR Excellence in Research

GAP Analysis (Charter and Code Checklist)

GAP Analysis (Charter and Code Checklist)

Case number

2022RO843264

Name Organisation under review

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"

Organisation’s contact details

Bogdan Petriceicu Hasdeu, nr. 8 , BUCURESTI, 050568, Romania

Date endorsement charter and code

06/10/2022

Submission date to the European Commission

11/06/2024

GAP Analysis overview

The Charter and Code provides the basis for the Gap analysis. In order to aid cohesion, the 40 articles have been renumbered under the following headings. Please provide the outcome of your organisation's GAP analysis below. If your organisation currently does not fully meet the criteria, please list whether national or organisational legislation may be limiting the Charter's implementation, initiatives that have already been taken to improve the situation or new proposals that could remedy the current situation. In order to help the organisation's recruitment strategy, a specific self-assessment checklist is provided for Open, Transparent and Merit-Based Recruitment.

European Charter for Researchers and Code of Conduct for the Recruitment of Researchers : GAP analysis overview

- **Status** : to what extent does this organisation meet the following principles?
- **Implementation (++ , +/- , -/+, --)** :
  - ++ fully implemented
  - +/- almost but not fully implemented
  - -/+ partially implemented
  - -- insufficiently implemented
- **GAP** : In case of --, -/+, or +/-, please **indicate the actual "gap"** between the principle and the current practice in your organisation.
- **Implementation impediments** : If relevant, please list any national/regional legislation or organisational regulation currently impeding implementation.
- **Initiatives undertaken/new proposals** : If relevant, please list any initiatives that have already been taken to improve the situation and/or new proposals that could remedy the current situation.

Status
Ethical and Professional Aspects

Status

1. Research freedom

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	- Lack of funding for access to all publications, consumables needed to carry out research. - Cumbersome procurement legislation and procedures. - Insufficient funding for young people at the beginning of their careers - The management and practices specific to research activities are not brought together in a unified framework and are not widely disseminated to enable guidance, primarily to young researchers, to become comfortable from the beginning of their careers with the correct understanding and approach to freedom of research. National/regional legislation or organisational regulation currently impeding implementation - Law No. 98/2016 on public procurement which does not provide flexibility for customization of the type of consumables needed depending on the results of the research at different stages; - The State Budget Law allocating to the Romanian Academy a budget for all subordinate research institutes, including the ICBP-NS. The allocated budget is mostly for salary expenses, and only to a small extent for the needs of upgrading equipment, maintenance and research consumables.	Establish a dedicated space on the website of the ICBP-NS, section Research, with relevant information on the means made available by the ICBP-NS to ensure freedoms and opportunities for research activity. Organization of training sessions in research ethics for PhD students and young researchers when they start working in the Institute. Legislative proposals to ensure flexibility of public procurement in research.

Status

2. Ethical principles

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	- The Code of Ethics contains elements to be updated in line with the 2023 edition of the European Code of Conduct for Research Integrity, including elements related to integrity. - Although documents on the principles of ethics and professional conduct are disseminated at the level of the ICBP-NS, communication needs to be improved to raise awareness and understanding of these and the European Code of Conduct principles.	Adding integrity-related elements to the Code of Ethics to promote the moral status that researchers should have (honesty, fairness and dignity). Organize mandatory ethics and integrity courses. Establish a dedicated space on the ICBP-NS website, Research section, with relevant information on how to apply the ethical principles and the work.

Status

3. Professional responsibility

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
-/+ partially implemented	The socio-economic responsibility aspects of the research activity are insufficiently developed in the internal documents with which the ICBP-NS operates, also insufficiently monitored and disseminated to the research staff.	Update procedures for research, innovation activities to clarify/evidence the researcher's responsibilities for cost-effectiveness in relation to outputs. Develop procedures and organise training sessions to raise staff awareness of social and economic responsibility Broadening access to scientific databases to include high-impact publications. Development of the ICBP-NS electronic platform with dedicated facilities to combat plagiarism and self-plagiarism. The Scientific Council will assign precise responsibilities to members for guiding and monitoring the integration of young people in the work of the Institute.

Status

4. Professional attitude

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	- Although there are procedures at institutional level to manage the research process at the substructure level, there are projects where the involvement of several departments plus the support of administrative departments is needed. Thus, it is necessary to have a procedure for the implementation of projects, coupled with the need to continuously inform researchers about their responsibilities for the implementation of a project, and for the exploitation of research results for the benefit of society. - Monitoring the parallel implementation of several projects subject to the specific regulations of the funding lines accessed is difficult to achieve in the absence of an electronic project management tool. National/regional legislation or organizational regulation currently impeding implementation - the legal regulations related to the financing mechanisms of grant-funded projects are not always respected, leading to cash-flow bottlenecks necessary to achieve the objectives as assumed in the financing contracts. - Law No 98/2016 on public procurement that does not provide flexibility for customization of the type of consumables needed depending on the results of research at different stages	Establish a dedicated space on the ICBP-NS website, Research section, with relevant information on the steps to follow in the process of identifying research opportunities . The implementation of a project implementation procedure, coupled with the need to continuously inform researchers about their responsibilities in the implementation of a project, and to exploit the research results for the benefit of society. Create an electronic project/programme management system that can be accessed on the intranet and that provides permanent information on the availability of resources (human, financial, material), deadlines for deliverables, milestones.

Status

5. Contractual and legal obligations

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	- The employment contracts make no reference to the know-how created at the level of the Institute and the parties that set it up. Provisions on know-how are only laid down in the grant contracts. - Intellectual property issues are only brought to the attention of researchers in activities that result in publications, patents. - There is no internal guidance on the internal regulations concerning the implications/obligations of the researcher/institution/funder with regard to the results obtained in the context of different types of funding/service contracts for research and innovation activities	Inclusion of know-how and intellectual property issues in job descriptions Develop an internal guide on internal regulations on the implications/obligations of the researcher/institution/funder on the results obtained in the context of different types of funding/service contracts for research and innovation activities. The implementation of a project implementation procedure, coupled with the need to continuously inform researchers about their responsibilities in the implementation of a project, and to exploit the research results for the benefit of society. Creation of a dedicated space on the ICBP-NS website, Research section, with relevant information on the steps to follow in the research process completed by obtaining results involving intellectual property rights.

Status

6. Accountability

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
-- insufficiently impleme…	- Insufficient staff awareness of socio-economic responsibility - public financial information is not updated on the existing web page, it will be included in the updated version currently being produced.	Creation of an electronic project/programme management system, with a component for tracking research deliverables and a component related to transparency and efficiency of financial resources. Management and practices specific to research activities, together with transparent and efficient financial management, are recommended to be brought together in a unified framework - the system OP - and to be widely disseminated. Update procedures for research, innovation activities to clarify/evidence the researcher's responsibilities for cost-effectiveness in relation to outputs Organise information sessions to raise staff awareness of socio-economic responsibility. Update the project website with a special section dedicated to financial transparency.

Status

7. Good practice in research

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	- there is no General Data Protection Regulation - GDPR - there is no backup system for storing research information/data. - obsolete backup system for storing information/research data. - Data protection systems need to be up-dated as the whole research data platform is being updated as a structure.	Drafting a General Data Protection Regulation - GDPR to transpose the legal provisions at the Institute level. The organization of training sessions on occupational safety conditions and prevention of existing risks will be recorded and published on the ICBP-NS website Annual report on the progress of the risk management process. up-to-date information/data backup and storage system, including data protection and security systems

Status

8. Dissemination, exploitation of results

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
-/+ partially implemented	- The ICBP-NS website does not have a user-friendly interface, with outdated information and without a platform containing structured data in terms of the research areas addressed. - There is no integrated communication plan to disseminate the results of the research carried out at the Institute. - No affiliations to international research networks/innovation hubs	Developing a communication plan, identifying means and target groups in order to maximise the exploitation of research results Encourage the establishment of partnerships to integrate the IBPC-NS into innovation clusters and thematic hubs/networks to enhance the exploitation of research results. Update and development of the IBPC-NS website: - structured, clear, with important and detailed information about the activity, history and present and future plans so that the vision of the IBPC-NS is transparent to visitors; - reorganisation of scientific information into a modern research platform - Creation of a dedicated space on the IBPC-NS website, within the Research section, for the dissemination and exploitation of research results

Status

9. Public engagement

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
-/+ partially implemented	- There is no integrated communication plan to disseminate the results of the research carried out at the Institute. - The ICBP-NS website does not have a user-friendly interface, with outdated information and without a platform containing structured data in terms of the research areas addressed.	Develop a dedicated space on the ICBP-NS website, for the exposure of research results/ideas by periodically monitoring the progress of applied research and informing the specialised public at all stages of the research.

10. Non discrimination

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	- The procedures are not updated with regard to gender criteria.	Update on Gender Criteria Procedures.

Status

11. Evaluation/ appraisal systems

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	- Partially functional evaluation system for research staff	Update of the internal staff performance appraisal procedure. Establish a system to improve performance by using modern methods/means.

Recruitment and Selection - please be aware that the items listed here correspond with the Charter and Code. In addition, your organisation also needs to complete the checklist on Open, Transparent and Merit-based Recruitment included in a separate section, which focuses on the operationalization of these principles.

Status

12. Recruitment

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
-/+ partially implemented	- The recruitment process is conditional on the approval of posts in the establishment plan and budget allocations for permanent posts. - Open, Transparent and Merit-Based Recruitment Policy is not completed and published on ICBP-NS website - Even though the principles of Open, Transparent and Merit-Based Recruitment Policy are largely contained in the recruitment, promotion, selection procedures and practices for all types of positions specific to the posts in the ICBP-NS, reformulations are needed to be fully in line with the requirements of the OTM-R. - It is necessary to complete some administrative tasks of the Human Resources Department corresponding to some requirements of the OTM-R. National/regional legislation or organisational regulation currently impeding implementation The State Budget Law allocating to the Romanian Academy a budget for all subordinate research institutes, including the ICBP-NS. The allocated budget is mainly intended for salary expenses as long as the posts in the organigram are approved and not blocked by budgetary restrictions.	- Consolidation of the existing strategy and procedures in a document regarding to OTM-R Policy - Publishing of the OTM-R Policy on ICBP-NS website - Elaboration internal guide setting out clear OTM-R procedures and practices for all types of positions - Training sessions for the OTM-R policy provisions. - Statistics of OTM-R training courses attendance will be separately - Update of the ICBP-NS Methodology for filling research vacancies, for full compliance with OTM-R policies - Complete the administrative tasks of the Human Resources Department for the implementation of the mandatory requirements of the OTM-R.

Status

13. Recruitment (Code)

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	- There is a need to increase the visibility of vacancies for researchers on the ICBP-NS website. - Even if the advertisements are published in all the online media specific to research, it is often necessary to republish the advertisements, making it difficult to recruit candidates. - The ads do not describe in detail the working conditions and career development prospects.	Development of an online application toolkit on IBPC-NS website Organizing events such as ICBP-NS Open Doors and sending information materials on career development opportunities within ICBP-NS for students in their final years at the relevant faculties. Participation in the Romanian Academy conferences, as well as in other academic events and job fairs dedicated to researchers, including at European level to popularize the Institute's activities and attract young people. Filling in advertisements with information on working conditions and career development prospects

Status

14. Selection (Code)

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	- For the specific conditions of posts outside the organisation chart, competitions organised on posts included in the framework of non-reimbursable projects, no training is organised beforehand for the members of the Commission. - The composition of the evaluation committees rarely includes experts from outside the Romanian Academy and from the private sector, given the nature of the ICBP-NS research activity, i.e. basic research.	Organise preliminary training sessions for the members of the Evaluation Committee for the recruitment of non-organisational research staff. Inclusion of health experts in the Evaluation Commissions as final beneficiaries of the results of the research carried out by the ICBP-NS.

15. Transparency (Code)

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	Not specified in detail in the text of the advertisement are the professional and career development opportunities that ICBP-NS can offer.	Filling in advertisements with information on working conditions and career development prospects

Status

16. Judging merit (Code)

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
-/+ partially implemented	The current criteria do not include issues related to fundraising, socio-economic accountability, research management.	Include in the selection procedure, where appropriate, criteria related to fundraising, socio-economic accountability, research management.

17. Variations in the chronological order of CVs (Code)

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	the ICBP-NS procedure for filling permanent or temporary research vacancies within or outside the organisation chart does not contain a distinct reference to the issue of variations in the CV timeline	The ICBP-NS procedure for filling vacant research posts, permanent or temporary, within or outside the organisation chart will be completed with separate reference to the aspect of variations in CV chronology.

18. Recognition of mobility experience (Code)

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
-/+ partially implemented	The ICBP-NS procedure for filling permanent or temporary research vacancies within or outside the organisation chart does not contain a separate reference to mobility experience.	The ICBP-NS procedure for filling vacant research posts, permanent or temporary, within or outside the organisation chart will be completed with a separate reference to the mobility experience aspect.

Status

19. Recognition of qualifications (Code)

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	the ICBP-NS procedure for filling permanent or temporary research vacancies within or outside the organisation chart does not contain a distinct reference to the recognition of formal and non-formal professional qualifications.	The ICBP-NS procedure for filling vacant research posts, permanent or temporary, within or outside the organisation chart will be completed with a separate reference to the criterion related to the recognition of formal and non-formal professional qualifications.

20. Seniority (Code)

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	The questionnaires for the written test do not include issues related to the candidate's vision of professional development.	Inclusion in the written test questionnaire of aspects related to the candidate's vision of professional development.

Status

21. Postdoctoral appointments (Code)

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	- Due to funding from different sources (projects, programmes, fellowships) there is no uniform criteria for the selection of postdoctoral staff. - There are no conditions for setting the maximum duration of appointment/activity in such a post except those set by programmes/projects.	Develop mobility programmes for R&D and innovation and/or other complementary skills for young researchers at postdoctoral level. Organize a Young Researchers Club to be a vehicle for their integration in the ICBP-NS research teams, to facilitate participation in mobilities, in events such as the Young Researchers Ideas Scholarship, Nicolae Simionescu Scholarship.

Working Conditions and Social Security

22. Recognition of the profession

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	- Evaluation of researchers' performance is done in a traditional way, without ensuring full transparency, which leads to subjective assessments of stakeholders.	Updating the performance appraisal system for all professional levels.

Status

23. Research environment

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	- Although the management and practices specific to research activities are well organised, they are not widely disseminated to enable young researchers in particular to be guided, from the beginning of their careers, to become comfortable with the correct understanding and approach to freedom of research. - The ICBP-NS infrastructure needs to be partially updated through ongoing projects that do not fully cover the identified needs - Although remote working conditions are regulated for RDI activities, including for PhD students and part-time researchers (fixed-term employment contracts), there are no internet facilities for this type of activities as well.	Development and implementation of internal regulations on remote working conditions and development of institutional information capacity for remote working. Establish a dedicated space on the website of the ICBP-NS, Research section, with relevant information on the means made available by the ICBP-NS to ensure freedoms and opportunities for research activity. Broadening access to scientific databases to include high-impact publications. Development of remote intranet facilities.

24. Working conditions

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	More benefits can be implemented for ICBP-NS employees to make the workplace more attractive and to increase creativity and willingness to devote more resources to research, e.g: - Including remote working - Sabbatical, etc.	Development and implementation of procedures on teleworking conditions/capacity building for teleworking and home working.

Status

25. Stability and permanence of employment

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	- Lack of a procedure for remote hybrid working National/regional legislation or organisational regulation currently impeding implementation Labour Code, limiting the conclusion of more than 3 successive fixed-term employment contracts	Develop a hybrid and remote working procedure.

26. Funding and salaries

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	The ICBP-NS must update the Internal Management Control Committee so that it can closely monitor the development of researchers and identify as soon as possible the errors that occur in terms of remuneration of employees, so that there are no unjustified discrepancies between those who have the same position and find the most advantageous solutions to create the most advantageous offers to stimulate young researchers.	Updating procedures, regulations so that they are more responsive to the needs of researchers at the Institute, to ensure that errors are avoided and to offer the most advantageous conditions for stimulating young researchers.

Status

27. Gender balance

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
++ fully implemented		

28. Career development

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	- Participation in continuous training activities is decided on an individual basis and is not part of a training strategy applicable to the Institute as a whole. - Evaluation of progress is ensured by traditional methods that do not correspond to modern means of feedback	Developing a comprehensive career development policy to provide the methodological framework for organising the work of researchers for career advancement Development of a feedback system for evaluating and reviewing the progress of early-stage researchers.

Status

29. Value of mobility

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	- There is a need for a more effective mobility strategy that encompasses all researchers' needs and sources of funding for mobility - Lack of mobility regulation in the ICBP-NS ROF	Update of the internal rules of the ICBP-NS on staff mobility Develop a more effective mobility strategy that encompasses all the needs of researchers, helping them to develop in their careers and to maximise their research development by creating the most advantageous opportunities. The strategy must include all sources of funding and regulate collaboration agreements with prestigious national and international institutions, as well as the implementation of more complex exchange programmes.

30. Access to career advice

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
-/+ partially implemented	- There is no provision for the development of a career plan, which becomes effective after employment, for the filling of a research post or for career advancement.	Entering into partnerships with industry stakeholders for workforce placement

Status

31. Intellectual Property Rights

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	There is no financial reward mechanism for research inventors, but their work is recognised in annual activity reports and their participation in events organised in the country or abroad is supported.	Training with junior researchers, in the field of protection and exploitation of intellectual property rights, in the system of "training of trainers" at departmental level Creation of a dedicated space on the website of the ICBP-NS on the protection and exploitation of intellectual property rights

32. Co-authorship

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	There are no training sessions on co-authorship at the level of the IBPC-NS that specify how to determine the actual contribution of each participant to a research output and the actual contribution as a co-author of a scientific paper, so that each can benefit from the right to be acknowledged and/or cited and quoted, according to the extent of his/her actual contribution, correctly determined.	Training in the application of a co-authorship procedure at the level of the ICBP-NS

Status

33. Teaching

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
++ fully implemented		

34. Complains/ appeals

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	The committees and administrative structures that may be involved in various types of conflicts/complaints arising among staff of the ICBP-NS are not popularised internally.	Publicise internally, via the intranet, the committees/structures and the regulations/instructions on their tasks

35. Participation in decision-making bodies

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	The results of the work of decision-making bodies, consultation committees/bodies, information are not popularised within the ICBP-NS community.	Develop internally, via the intranet, a section dedicated to the publication of the activities of the committees/management structures and their decisions of public interest, structured by the operational areas of the Institute: education, research, innovation, human resources, administrative capacity.

Status

Training and Development

36. Relation with supervisors

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
-/+ partially implemented	- The ICBP-NS has not developed a career development policy that mentions a training pathway tailored to career level and proposes a strategic approach to mentoring and supervision activities. National/regional legislation or organisational regulation currently impeding implementation GC no. 57/2002 lack of framework for implementation of supervision activities for postdocs, assistants and lecturers	Bringing together all resources dealing with training and professional development to include multidimensional career management tasks, including assisting young researchers from admission, mentoring, tracking progress and research results, career development counselling Organize periodical webinars dedicated to young researchers to update scientific progress on specific areas of knowledge of the research activity carried out at the level of all ICBP-NS departments.

37. Supervision and managerial duties

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	Supervisory activities are not carried out systematically in the absence of a framework regulating the work of the supervisor and the mentee National/regional legislation or organisational regulation currently impeding implementation GO no. 57/2002 lack of framework for implementation of supervision activities for postdocs, assistants and lecturers	Developing a mentoring and career supervision strategy to strengthen the position of mentors Organise training programmes for mentors and leadership developers

Status

38. Continuing Professional Development

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
-/+ partially implemented	- Participation in continuous training activities is decided on an individual basis and is not part of a training strategy applicable to the Institute as a whole. - There is no methodological framework for organising the work of researchers to support them in their career development. - There is no provision for the development of a career plan, which becomes effective after employment, for the filling of a research post or for career advancement.	Developing a comprehensive career development policy to provide the methodological framework for organising the work of researchers for career advancement Develop career-specific training programmes, including career planning tools.

39. Access to research training and continuous development

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
-/+ partially implemented	- Participation in continuous training activities is decided on an individual basis and is not part of a training strategy applicable to the Institute as a whole. - Although the ICBP-NS runs continuous training programmes, these are only to a small extent aimed at improving employability.	Developing a comprehensive career development policy to provide the methodological framework for organising the work of researchers for career advancement Organise interdisciplinary programmes aimed at improving employability by developing the skills and competences of young researchers

Status

40. Supervision

Implementation	GAP / Implementation impediments	Initiatives undertaken/new proposals
+/- almost but not fully i…	Evaluation of progress is ensured by traditional methods that do not correspond to modern means of feedback	Development of a feedback system for evaluating and reviewing the progress of early-stage researchers.

HR Excellence in Research

Action Plan

Action Plan

Case number

2022RO843264

Name Organisation under review

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"

Organisation’s contact details

Bogdan Petriceicu Hasdeu, nr. 8 , BUCURESTI, 050568, Romania

Submission date to the European Commission

11/06/2024

1. Organisational Information

*Please provide a limited number of key figures for your organisation. Figures marked * are compulsory.*

STAFF & STUDENTS	FTE
Total researchers = staff, fellowship holders, bursary holders, PhD. students either full-time or part-time involved in research *	88
Of whom are international (i.e. foreign nationality) *	9
Of whom are externally funded (i.e. for whom the organisation is host organisation) *	0
Of whom are women *	67
Of whom are stage R3 or R4 = Researchers with a large degree of autonomy, typically holding the status of Principal Investigator or Professor. *	23
Of whom are stage R2 = in most organisations corresponding with postdoctoral level *	22
Of whom are stage R1 = in most organisations corresponding with doctoral level *	43
Total number of students (if relevant) *	17
Total number of staff (including management, administrative, teaching and research staff) *	124

RESEARCH FUNDING (figures for most recent fiscal year)	€
Total annual organisational budget	4321815
Annual organisational direct government funding (designated for research)	2068340
Annual competitive government-sourced funding (designated for research, obtained in competition with other organisations – including EU funding)	2253475

RESEARCH FUNDING (figures for most recent fiscal year)	€
Annual funding from private, non-government sources, designated for research	0

ORGANISATIONAL PROFILE (a very brief description of your organisation, max. 100 words)

ICBP-NS is a biomedical research institute founded in Bucharest-1979, Romania which operates under the Romanian Academy, a EU Centre of Excellence and member of the UNESCO-Molecular Cell Biology Network. Research program includes fundamental and preclinical studies in diseases of the cardiovascular system; therapeutic strategies in precision medicine.The research takes place within 8 interconnected compartments, central laboratories and a modern biobase serving all projects. ICBP-NS has a state-of-art research infrastructure and runs a doctoral program and is involved in organization of courses, lectures, practical courses, symposia and congresses. The researchers are involved in multidisciplinary projects, in collaboration with universities and clinics.

2. Strengths and weaknesses of the current practice

Please provide an overview of the organisation in terms of the current strengths and weaknesses of the current practice under the four thematic headings of the Charter and Code at your organization.

Note: Click on the name of each of the four thematic headings of the Charter and Code to open the editor and provide your answer.

Ethical and professional aspects*

Strengths and Weaknesses (max. 800 words)

Strengths

- The ethical and professional aspects are mostly included in the institutional documents.
- The Strategy, the Code of Ethics and the ICBP-NS Organization and Operation Regulation include guidelines regarding the initiation, identification of sources and the conduct of research, research methods and research ethics, including avoiding plagiarism.
- At the level of the Institute, there are documents aligned with European requirements regarding ethical and professional aspects:

- OP regarding the conduct of research activities - methods and management of research results
- Risk management register.
- specific procedures for recruitment and selection, as well as for personal performance evaluation based on non-discriminatory criteria
- OP regarding the organization of occupational health and safety activities and labor protection.
- Security, prevention and protection plan,
- The Gender Equality Strategy and the Gender Equality Plan. https://www.icbp.ro/static/en/en-research/gender_equality_strategy.html
- The OP for financial-accounting operations includes checking the compliance and correctness of expenses at each stage of project implementation.
- In addition, the Internal Managerial Control Commission, through the risk management OP, monitors the financial management at the level of the institute, duplicated by the Internal Public Audit Procedure carried out by the Romanian Academy.

- Researchers respect the recognized ethical practices and ethical principles corresponding to the fields in which they practice research activity, in accordance with the Code of Ethics
- ICBP-NS, as a publicly funded institution, respects the rules of transparency and budgetary supervision of public funding.
- In ICBP-NS, optimal working conditions are ensured, ensuring compliance with national legislation regarding labor protection measures, occupational health and safety, and data protection.
- ICBP-NS does not allow or encourage any form of discrimination.

- The Human Resources department of ICBP-NS is responsible for respecting working conditions and data protection and their confidentiality.
- Project contracts, from European and national funding sources, contain specific obligations included in the Funding Guidelines and which are assumed by the institution, delegated under the coordination of the project director, and brought to the attention of the research team with the signing of the project work contracts, the attributions and the responsibilities being contained in the job description of each researcher.
- **Dissemination of research results** is carried out:
- According to the strategic objective of the Institute through publications in scientific journals, this represents one of the most important responsibilities of researchers.
- In scientific and educational events organized by ICBP-NS
- When participating in national and international scientific, technical, invention and innovation events,
- For the research projects implemented by ICBP-NS researchers through web pages specially created within the projects, on the Institution's web page or through other communication channels.

Weaknesses

- The code of ethics contains elements that must be updated in accordance with the 2023 edition of the European Code of Conduct for Research Integrity, including elements related to integrity.
- Although at the ICBP-NS level the documents on the principles of ethics and professional conduct are disseminated, communication must be improved in terms of awareness and understanding of them and the principles of the European Code of Conduct.
- The aspects related to the socio-economic responsibility that the research activity implies is insufficiently developed in the internal documents with which IBPC-NS operates, also insufficiently monitored, and disseminated at the level of the research staff.
- Monitoring the progress of several projects in parallel that are subject to the specific regulations of the financing lines accessed is difficult to achieve without an electronic project management tool
- There is no concise internal guidance on the internal regulations regarding the implications/obligations of the researcher/institution/funder regarding the results obtained in the context of different types of funding/service contracts for research and innovation activities
- Insufficient funding for access to all scientific publications, to consumable materials necessary for carrying out all research projects.
- There is no integrated communication plan to disseminate the results of the research carried out at the level of the Institute
- there is no General Data Protection Regulation - GDPR
- The procedures are not updated in terms of gender criteria

- the backup system for storing research data is outdated, including the data protection systems that require updates
- The IBPC-NS website does not have a user-friendly interface, with out-of-date information and without a platform that contains structured data regarding the research fields addressed
- public financial information is not updated on the existing web page.

Recruitment and selection*

Strengths and Weaknesses (max. 800 words)

Strengths

- ICBP-NS has as a strategic objective attracting young researchers, doctoral students, and postdoctoral students.
- Positions are filled through public competition, applying ICBP-NS internal regulations, developed in accordance with national legislation that respects the principles of transparency, non-discrimination, equal opportunities, and quality standards specific to the position level.
- The process of recruitment and selection of personnel in ICBP-NS is differentiated according to the type of job and the position in the job hierarchy.
- Guiding competitors and supervising the process of recruitment, selection and promotion of researchers is a task that the institution fulfills.
- All advertisements for research job vacancies are drafted according to the Romanian legal provisions in place and published on the institutional website (https://www.icbp.ro/news/news.php?lang=en), on euraxess.gov.ro and on jobs.research.gov.ro
- The application includes specific conditions for potential candidates which means that only suitable researchers can meet the recruitment conditions.
- The constitution of the Evaluation Committee is based on criteria of academic merit and recognition, the members of the Committee participate in formal and informal debates, including what concerns the development of the candidate evaluation process.
- The internal regulations applied for the filling of vacant positions provide for the differentiation of the composition of the commissions and the practices used for selection, depending on the specifics of the vacant position.
- After the completion of the selection process, each candidate is informed about the selection results by e-mail/phone and on the ICBP-NS website.
- In the evaluation of candidates, ICBP-NS has a flexible approach regarding experience and age for access to a position, variations in the professional activity of candidates are not penalized, mobility experience is a plus in the evaluation of candidates, it also covers professional, formal and non- formal to the extent that they are relevant for the specifics of the targeted positions.

Weaknesses

- The recruitment process is conditioned by the approval of the positions in the organizational chart and the budget allocations for the permanent positions.

- Even if the principles of the Open, Transparent and Merit-Based Recruitment Policy are included in the majority of the procedures and practices of recruitment, promotion, selection for all types of positions specific to the positions in ICBP-NS, reformulations are necessary to be in full agreement with OTM-R requirements.
- Open, Transparent and Merit-Based Recruitment Policy is not completed and published on ICBP-NS website.
- It is necessary to complete some administrative duties of the Human Resources Department corresponding to OTM-R requirements.
- Even if the announcements are published in all online media specific to research, it is often necessary to republish the announcements, as it is difficult to recruit candidates.
- The ads do not describe in detail the working conditions and career development prospects.
- For the specific conditions of positions outside the organizational chart, competitions organized for positions included in the projects with non-reimbursable financing, no prior training of Commission members is organized.
- The component of the evaluation commissions rarely includes experts from outside the members of the Romanian Academy and from the private sector considering the nature of the ICBP-NS research activity, respectively fundamental research.
- Current criteria do not include aspects related to fundraising, socio-economic responsibility, research management.
- Due to funding from different sources (projects, programs, scholarships) there are no uniform criteria for the selection of postdoctoral staff.
- Due to the lack of legal regulations, it is not possible to establish the maximum duration of postdoctoral appointment/activity, except for those established by programs/projects.

Working conditions*

Strengths and Weaknesses (max. 800 words)

Strengths

- ICBP-NS researchers go through the performance evaluation process annually, based on the criteria included in the Internal Performance Evaluation Procedure, by establishing quantitative and qualitative criteria specific to the career level and aligned with international standards.
- ICBP-NS has high-performance research infrastructures, laboratories, modern equipment and has in the implementation phase other new investments for research activity.
- ICBP-NS ensures remote collaboration within research networks.
- The individual employment contract practiced by ICBP-NS is created in the interest of the researcher, the conditions related to the protection and safety at work are ensured as regulated in the national legislation and transposed in the OP regarding the organization of the safety and health at work activity and the labor protection.
- Within the ICBP-NS, the principles regarding equal opportunities, non-discrimination are respected, both in terms of access for people with disabilities, and according to gender declaration.
- ICBP-NS respects in all the actions it undertakes the principles related to equal opportunities and equal treatment according to the number of women and men.
- The contracts for the research staff for an indefinite period are similar to the contracts of the staff employed in public institutions and to those of the permanent staff.
- ICBP-NS employees have facilities related to the work schedule: possibility of part-time work, flexible hours, facilities for young parents.
- At the national level, researchers have fiscal facilities for the CD activities carried out within the projects, by applying tariffs aligned at the European level.
- In ICBP-NS, the stability and continuity of employment for researchers is ensured.
- Within the ICBP-NS there is flexibility regarding the possibilities of hiring researchers on research projects, which stimulates participation in research projects.
- The main source of funding for ICBP-NS is access to research projects with non-reimbursable funding, supplemented by funds from the state budget allocated through the Romanian Academy
- Researchers have the opportunity to participate in multiple research career development programs, financed through own, national and structural funds.
- It is encouraged to participate in short-term mobilities for traveling to conferences, workshops, working groups or coordinating activities of doctoral students in co-supervision.
- In ICBP-NS, researchers are recognized as independent authors and co-authors in accordance with international practice in the field.

- The resolution of complaints regarding ethical issues rests with the Ethics Commission.
- Conflicts regarding rights and working conditions can also be resolved at the level of the Disciplinary Committee.
- Researchers are represented in advisory and decision-making bodies, where they can defend and promote not only personal interests, but also collective ones.
- The permanent research staff chooses the representatives in the commissions of the institute.

Weaknesses

- The evaluation of researchers' performances is done in a traditional way, without ensuring full transparency.
- Although the Management and specific practices of research activities are well organized, they do not have a wide dissemination and a specific methodology that includes the guidance, primarily of young researchers, to accommodate from the beginning of their career with the correct understanding and approach of freedom of research.
- The ICBP-NS infrastructure requires an update partially ensured by the ongoing projects but which do not fully cover the identified needs
- Although there are rules, there is no procedure regarding working remotely in a hybrid regime.
- At the ICBP-NS level, the Managerial Internal Control Committee must be updated so that it can closely follow the evolution of researchers and identify in the shortest possible time the errors that appear in terms of employee remuneration, so that unjustified discrepancies do not appear between those who have the same position and to find the most advantageous solutions to create the most advantageous offers to stimulate young researchers.
- Participation in continuous training activities is decided individually, not being part of a training strategy applicable unitarily at the level of the institute.
- A more effective mobility strategy is needed that includes all the needs of researchers and the sources of accessing funds for mobility, information that must also be updated in the Organization and Functioning Regulations of ICBP-NS
- It is not provided for the occupation of a research position or for career advancement, the development of a career plan, which becomes effective after the occupation of the position.
- There is no financial reward mechanism for inventor researchers, but their activity is recognized in the annual activity reports and their participation in events organized in the country or abroad is supported.
- There are no co-authorship training sessions at the ICBP-NS level.
- The results of the activity of decision-making bodies, commissions/consultation bodies, information are not popularized at the level of the ICBP-NS community.

Training and development*

Strengths and Weaknesses (max. 800 words)

Strengths

- ICBP-NS participates in the training of doctoral students, at the level of the institute being a number of 7 doctoral coordinators.
- Doctoral studies are carried out based on the Operational Procedure regarding the organization of doctoral programs that also aim to support the thesis. Each PhD student benefits from tutoring and guidance from the coordinator or supervisor.
- Doctoral students, post-doctoral students, research assistants, novice researchers of ICBP-NS are integrated into the research teams within the departments, on specific projects and are guided throughout the activity by senior researchers and project coordinators.
- Young researchers participate in courses to develop research skills, to support innovative approaches in higher education and to stimulate attitudes and skills, respectively to increase the scientific capacity of research teams through international collaborations.
- ICBP-NS has a constant concern to develop research and transversal skills to ensure career success and performance.
- Complementary to assisted research activities, professional training courses, doctoral students, postdoctoral students and debut researchers from IBPC-NS benefit from counseling and career guidance activities.
- At the ICBP-NS level, researchers have the opportunity to participate in multiple research career development programs, financed through their own, national and structural funds.
- It is encouraged to participate in short-term mobilities for traveling to conferences, workshops, working groups or coordinating activities of doctoral students in co-supervision.
- ICBP-NS organizes workshops, intensive courses and lectures with Romanian or foreign guests to develop certain components of the research activity.
- The members of the Scientific Council have the necessary experience to guide the research, they have the availability of time, knowledge, experience, competence and commitment to provide adequate support to young researchers.

Weaknesses

- Even if at the level of the ICBP-NS strategy attracting young researchers is a main objective, the institute has yet to develop a Career Development Policy in which a personalized training path is mentioned in relation to the career level, and which proposes a strategic approach to mentoring and supervision activities.

- Supervision activities are not carried out systematically in the absence of a regulatory framework for the activity of the supervisor and the mentee.
- Participation in continuous training activities is decided individually, not being part of a training strategy applicable unitarily at the level of the institute.
- There is no methodological framework for organizing the activity of researchers to support them in their career development.
- It is not provided for the occupation of a research position or for career advancement, the development of a career plan, which becomes effective after the occupation of the position.

3. Actions

The Action Plan and HRS4R strategy must be published on an easily accessible location of the organisation’s website.

Please provide the web link to the organization's Action Plan/HR Strategy dedicated webpage(s):

https://www.icbp.ro/static/en/en-careers/otmr_strategy_hrs4r.html (https://www.icbp.ro/static/en/en-careers/otmr_strategy_hrs4r.html)

Please fill in the list of all individual actions to be undertaken in your organisation's HRS4R to address the weaknesses or strengths identified in the Gap-Analysis. The listed actions should be concise, but detailed enough for the assessors to evaluate the level of ambition, engagement and the expected implementation process. The institution should strive to provide a detailed plan, not just an enumeration of actions.

Note: Choose one or more of the principles automatically retrieved from the GAP Analysis with their implementation ratings.

Proposed ACTIONS

Action 1	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Updating and modernizing the ICBP-NS website to create a user-friendly interface for informing the public about research progress	(--) 6. Accountability	
	(-/+) 8. Dissemination, exploitation of results	Y2/S1
	(-/+) 9. Public engagement	

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Working Group/Taskforce	- website with relevant information for the target groups targeted by the research results carried out by ICBP-NS (8,9) - website with updated links to all the projects carried out by ICBP-NS (8) - website with financial information (6) - no. website visitors

Proposed ACTIONS

Action 2	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Updating the dedicated space on the ICBP-NS website, in the Research section, with relevant information about research opportunities	(+/-) 1. Research freedom (+/-) 4. Professional attitude (-/+) 8. Dissemination, exploitation of results (+/-) 23. Research environment	Y1/S2

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Steering Committee Working Group/Taskforce (TF)	- website with relevant information regarding opportunities related to freedoms and opportunities for research activity on the "Research" section

Proposed ACTIONS

Action 3	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Creating a dedicated space on the ICBP-NS website regarding ethics and intellectual property	(+/-) 2. Ethical principles (+/-) 5. Contractual and legal obligations (+/-) 31. Intellectual Property Rights	Y1/S2

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Steering Committee The Ethics Committee	- website with relevant information regarding ethical principles and intellectual property rights on the "Research" section (2,5, 31); - Operating Regulations for the Ethics Committee (2)

Proposed ACTIONS

Action 4	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Developing facilities and benefits through the ICBP-NS intranet network and promoting it among the institute's researchers	(+/-) 23. Research environment (+/-) 34. Complains/ appeals (+/-) 35. Participation in decision-making bodies	Y1/S2

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
The Internal Management Control Committee Working Group/TF	- Intranet for Remote Work (23) - Information on the intranet network regarding the activities of committees/structures and regulations/instructions outlining their responsibilities structured across the operational domains of the institute: education, research, innovation, human resources, administrative capacity. (34,35)

Proposed ACTIONS

Action 5	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Proposals for updating regulations in the field of public procurement for consumables specific to research activities	(+/-) 1. Research freedom	Y1/S2

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Working Group/TF	- Memorandum regarding the flexibility of public procurement in the field of research. - Number of entities to which the memorandum is transmitted - Feedback from authorities

Proposed ACTIONS

Action 6	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Updating existing procedures at the ICBP-NS level and aligning them with HRS4R standards	(-/+) 3. Professional responsibility (--) 6. Accountability (+/-) 24. Working conditions (+/-) 25. Stability and permanence of employment (+/-) 26. Funding and salaries	Y1/S2

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
The Internal Management Control Committee Steering Committee	-Integrated Research and Administrative Operations (RAO) System (6) - Updated procedures and regulations (3,6,26) - Development and implementation of a procedure regarding hybrid and remote working conditions/developing remote working capacity and home office work. (24,25)

Proposed ACTIONS

Action 7	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Updating selection and recruitment procedures at the ICBP-NS level to improve the institute's performance by creating a more diverse area for recruiting researchers	(-/+) 16. Judging merit (Code) (+/-) 17. Variations in the chronological order of CVs (Code) (-/+) 18. Recognition of mobility experience (Code) (+/-) 19. Recognition of qualifications (Code)	Y1/S2

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Working Group/TF	- Operational Procedure for Personnel Selection with criteria related to fundraising, socio-economic responsibility, and research management. (16,17) - Operational Procedure for Personnel Selection with criteria related to filling vacant, permanent, or temporary research positions, within or outside the organizational chart, with distinct reference to mobility experience and recognition of professional, formal, and non-formal qualifications. (18,19)

Proposed ACTIONS

Action 8	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Updating internal performance evaluation procedures using modern methods/tools	(+/-) 11. Evaluation/ appraisal systems (+/-) 22. Recognition of the profession	Y1/S2

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Scientific Council Working Group/TF	- Updated Operational Procedure for staff performance evaluation, including all professional levels (11, 22) - Introducing modern methods/tools for enhancing performance improvement systems (11)

Proposed ACTIONS

Action 9	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Development and implementation of internal regulations regarding remote working conditions and the institutional digital capacity for remote work	(+/-) 23. Research environment	Y2/S1

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Working Group/TF	Regulation concerning remote working conditions and the development of institutional informational capacity for remote work

Action 10	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Creation of a regulation regarding staff mobility and the engagement of foreign partners for collaboration through partnerships in project implementation and exchange of know-how and experience	(+/-) 29. Value of mobility	Y2/S1

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Scientific Council Steering Committee	- Updated internal regulation detailing staff mobility and the recruitment of foreign personnel. - Number of exchanges of experience and know-how with international partners

Proposed ACTIONS

Action 11	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Updating the Code of Ethics and Procedures regarding gender criteria to regulate aspects such as gender criteria, data protection, integrity, and morality of researchers both within and outside the institute	(+/-) 2. Ethical principles (+/-) 7. Good practice in research (+/-) 10. Non discrimination	Y1/S2

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
The Ethics Committee Steering Committee	- Updated code of ethics incorporating elements related to integrity (2) - General Data Protection Regulation (GDPR) Policy (7) - Updated procedure regarding gender criteria (10)

Proposed ACTIONS

Action 12	**GAP Principle(s)**	**Timing (at least by year's quarter/semester)**
Institute-wide researcher education for project implementation, result valorization, and the establishment of an electronic project management system to facilitate their implementation	(+/-) 4. Professional attitude (+/-) 5. Contractual and legal obligations (--) 6. Accountability	Y2/S1

Responsible Unit	**Indicator(s) / Target(s)**
Steering Committee Working Group/TF	- General procedure for project implementation, including aspects of research results valorization for the benefit of society. (4,5) - Electronic project management system to operate on the intranet. (4,6) - Guide on regulations regarding the implications/obligations of the researcher/institution/funder regarding the results obtained within the context of various types of funding/service contracts for research and innovation activities. (5)

Proposed ACTIONS

Action 13	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Developing the capacity of researchers at ICBP-NS to ensure the avoidance of plagiarism and self-plagiarism, and encouraging the publication of scientific articles in specialized journals/ publications	(-/+) 3. Professional responsibility (+/-) 5. Contractual and legal obligations	Y1/S2

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Scientific Council	Program for combating plagiarism and self-plagiarism on the intranet

Proposed ACTIONS

Action 14	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Research results valorization through improved communication, dissemination of know-how, and intellectual property awareness, encouraging researchers to actively participate in these efforts	(+/-) 5. Contractual and legal obligations (-/+) 8. Dissemination, exploitation of results	Y2/S2

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Steering Committee	- Communication plan with identifying means and target groups to maximize the valorization of research results. (8) - Updated job descriptions for researchers, including aspects related to know-how and intellectual property. (5)

Proposed ACTIONS

Action 15	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Establishing partnerships to facilitate scientific research as well as the valorization of its results	(-/+) 8. Dissemination, exploitation of results	Y2/S2

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Scientific Council	Number of partnerships for integrating ICBP-NS into innovation clusters and hubs/networks/themes for enhancing the valorization of research results.

Proposed ACTIONS

Action 16	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Strengthening HR operations at the ICBP-NS level in alignment with the OTM-R Policy	(-/+) 12. Recruitment (+/-) 13. Recruitment (Code) (+/-) 14. Selection (Code) (+/-) 15. Transparency (Code)	Y2/S1

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Steering Committee Working Group/TF	- OTM-R policy document - Website containing OTM-R policy document - Internal guide for OTM-R policy implementation - Updated recruitment/selection Operational Procedure in accordance with the OTM-R policy. - Updated job description for HR responsible regarding OTM-R policy implementation

Proposed ACTIONS

Action 17		
Creating an online application form to streamline the process for interested individuals applying for vacant positions at ICBP-NS	**GAP Principle(s)**	**Timing (at least by year's quarter/semester)**
	(+/-) 13. Recruitment (Code) (+/-) 14. Selection (Code)	Y1/S2

Responsible Unit	**Indicator(s) / Target(s)**
Working Group/TF	online application toolkit (13,14)

Proposed ACTIONS

Action 18	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Enhancing the performance evaluation and career development process	(+/-) 11. Evaluation/ appraisal systems (+/-) 13. Recruitment (Code) (+/-) 14. Selection (Code) (+/-) 15. Transparency (Code) (+/-) 20. Seniority (Code)	Y2/S2

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Scientific Council	-online application toolkit for the performance autoevaluation (11) - Recruitment announcements completed with written information in the letter of intent regarding working conditions and career development prospects. (13,14,15) - Incorporating into the written test questionnaire aspects related to the candidate's vision of professional development. (20)

Proposed ACTIONS

Action 19	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Educating researchers in the field of research ethics and raising awareness regarding socio-economic responsibility	(+/-) 1. Research freedom (+/-) 2. Ethical principles (-/+) 3. Professional responsibility (--) 6. Accountability	Y2/S2

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Steering Committee The Ethics Committee	- Semesterly training sessions on research ethics aimed at doctoral students and young researchers. (1) - Biannual training sessions aimed at increasing staff awareness regarding social and economic responsibility. (3,6) - Annual courses on ethics and integrity. (2)

Proposed ACTIONS

Action 20	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Training staff on occupational safety conditions and risk prevention	(+/-) 7. Good practice in research	Y2/S1

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Working Group/TF Occupational Health and Safety Committee	Annual training sessions on occupational safety conditions and risk prevention.

Proposed ACTIONS

Action 21	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Creating career development opportunities for students	(+/-) 13. Recruitment (Code) (+/-) 14. Selection (Code)	Y2/S2

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Working Group/TF	- Annual Open House events - Number of flyers distributed in the academic environment - Number of young people interested in applying for jobs at ICBP-NS

Proposed ACTIONS

Action 22	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Promoting ICBP-NS to attract young researchers through participation in scientific events, university events, and other similar gatherings	(+/-) 13. Recruitment (Code) (+/-) 14. Selection (Code)	Y2/S2

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Steering Committee Working Group/TF	- Number of participations in job fairs dedicated to researchers - Number of new collaborations - Number of visits on the ICBP-NS website - Number of interested young individuals

Action 23	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Developing mobility programs for research	(+/-) 21. Postdoctoral appointments (Code)	Y2/S1

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Scientific Council	Number of mobility programs for young postdoctoral researchers

Proposed ACTIONS

Action 24	**GAP Principle(s)**	**Timing (at least by year's quarter/semester)**
Integration of young researchers into the ICBP-NS research teams	(+/-) 21. Postdoctoral appointments (Code)	Y2/S2

Responsible Unit	**Indicator(s) / Target(s)**
Steering Committee Working Group/TF	- Establishing a Young Researchers Club - Number of activities generated within the Club

Action 25	**GAP Principle(s)**	**Timing (at least by year's quarter/semester)**
Guiding and monitoring the integration of young individuals into Institute activities	(-/+) 3. Professional responsibility	Y2/S1

Responsible Unit	**Indicator(s) / Target(s)**
Steering Committee Working Group/TF	- Guidance sheets for young researchers - Number of young researchers

Proposed ACTIONS

Action 26	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Updating scientific progress in specific areas of knowledge related to research activities conducted at all ICBP-NS departments, including the protection and valorisation of intellectual property rights	(+/-) 31. Intellectual Property Rights (-/+) 36. Relation with supervisors (-/+) 39. Access to research training and continuous development	Y2/S2

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Scientific Council	- Number of scientific seminars aimed at updating young researchers on scientific findings within ICBP-NS departments, specifically focusing on intellectual property rights protection and valorization, as well as enhancing the skills and competencies of young researchers to improve employability. - Number of trained young researchers

Proposed ACTIONS

Action 27		
Enhancing the capacity of mentors in training young researchers	**GAP Principle(s)**	**Timing (at least by year's quarter/semester)**
	(-/+) 30. Access to career advice (+/-) 37. Supervision and managerial duties	Y1/S2

Responsible Unit	**Indicator(s) / Target(s)**
Steering Committee Working Group/TF	- Number of mentor training sessions (37) - Number of mentors providing training and career development for young researchers - Number of partnerships with stakeholders (30)

Proposed ACTIONS

Action 28		
Developing a mentorship and career development strategy	**GAP Principle(s)**	**Timing (at least by year's quarter/semester)**
	(+/-) 29. Value of mobility	
	(-/+) 36. Relation with supervisors	Y2/S1
	(+/-) 37. Supervision and managerial duties	

Responsible Unit	**Indicator(s) / Target(s)**
Steering Committee Working Group/TF	- Career development mentorship strategy (37) - Updated internal regulation detailing mobilities (29) - Number of researchers supervised through mentoring activities (36,37) - Number of young researchers receiving career development counseling (36)

Proposed ACTIONS

Action 29	GAP Principle(s)	Timing (at least by year's quarter/semester)
Facilitating the development and evolution of researchers in the field of research through the creation of tools to stimulate their research efforts	(+/-) 28. Career development (-/+) 38. Continuing Professional Development (-/+) 39. Access to research training and continuous development (+/-) 40. Supervision	Y2/S1

Responsible Unit	Indicator(s) / Target(s)
Steering Committee Working Group/TF	- Developing a career development policy (28) - Evaluation and review system for career development progress (38,39,40) - Number of researchers advancing in their careers

Unselected principles:

(++) 27. Gender balance (+/-) 32. Co-authorship (++) 33. Teaching

The establishment of an Open Recruitment Policy is a key element in the HRS4R strategy. Please also indicate how your organisation will use the Open, Transparent and Merit-Based Recruitment Toolkit and how you intend to implement/are implementing the principles of Open, Transparent and Merit-Based Recruitment. Although there may be some overlap with a range of actions listed above, please provide a

short commentary demonstrating this implementation. If the case, please make the link between the OTM-R checklist and the overall action plan. (max. 1000 words) *

The process of recruitment and selection of researchers in ICBP-NS respects the principles of an open, transparent, merit-based recruitment established by national regulations that have been transposed into the Procedures for the recruitment and selection of personnel for vacant or temporarily vacant positions within and outside the organization chart.

The procedures will be reviewed in accordance with the requirements specified in the OTM-R checklist.

The procedures for the recruitment and selection of personnel for vacant or temporarily vacant positions within and outside the organization chart, include specific conditions for auxiliary technical research personnel and for administrative personnel, for personnel recruited on research projects and respect the OTM-R principles, called lines internal directories.

The relevant aspects will be published on the ICBP-NS website.

In order to adopt such an implementation that provides for the fulfillment of the objectives established in the OTM-R Checklist, a person will be appointed from the administrative structure of ICBP-NS, respectively the human resources manager who will have the general responsibility for the realization and implementation of the procedures OTM-R, including ensuring the proper functioning of internal guidelines. This will be assisted during the 2 years of implementation of the proposed Action Plan by the representatives of the Steering Committee, of the Working Group, as well as of the Stakeholders, both regarding the implementation of the proposed actions, and regarding compliance with the proposed calendar.

If your organisation already has a recruitment strategy which implements the principles of Open, Transparent and Merit-Based Recruitment, please provide the web link where this strategy can be found on your organisation's website:

URL:

https://www.icbp.ro/resources/static_files/Grants/cardiopro/Proiectarea%20SCIM%20si%20implementarea%20la%20nivelul%20Institutului.pdf (https://www.icbp.ro/resources/static_files/Grants/cardiopro/Proiectarea%20SCIM%20si%20implementarea%20la%20nivelul%20Institutului.pdf)

4. Implementation

General overview of the expected overall implementation process of the action plan: (max. 1000 words)

The analysis of internal regulations and practices in ICBP-NS regarding the fulfillment of the 40 principles of C&C highlighted the aspects in different areas of activity that need to be improved.

Summarizing these aspects, they were grouped into 10 categories that summarize the actions that will be taken to fulfill the C&C principles:

1. Developing and updating the existing procedures in order to align with HRS4R
2. Developing guidelines in order to support the implementation of the procedures
3. Creating a dedicated space on the ICBP-NS website, Research section, with relevant information on ethical and professional aspects
4. Development of modern application-type tools on the ICBP-NS website
5. Organizing training sessions
6. Additional responsibilities related to multidimensional career management with a role in the implementation of the RU strategy aligned with OTM-R Policy
7. Actions related to information, dissemination and awareness
8. Promoting the exchange of experience through mobility
9. Update of the backup system and storage of information/data, including data protection and security system solutions
10. Proposals to ensure the flexibility of public procurement in the field of research

The proposed actions will be the main vehicle to support the achievement of the objectives identified in the ICBP-NS Strategy and Management Plan (2023-2027).

The proposed action plan represents the transformation of the forecasts of the Research Human Resources Strategy component of ICBP-NS into concrete implementation phases over a multi-year period, with a supervisory structure and responsible persons assigned to carry out each action within the action plan as well as to achieve corresponding implicit strategic objectives.

The action plan will be implemented by the structures mentioned as Responsible and will benefit from the support of a Coordination Committee as described in the Process Description. It will coordinate and evaluate the implementation process of the ICBP-NS Action Plan.

The ICBP-NS research community will participate in the action plan implementation process by:

1. representatives of the research community, members of the coordination committee,
2. The working group, which participated in the initial phase, will continue to play its role as the main vehicle in the development of the process and will turn into a Monitoring Committee that will contribute to the implementation of the proposed actions and evaluate the implementation progress, to identify in real time problems that may arise during implementation. The Monitoring Committee will report periodically to the Coordination Committee on the progress of each action.
3. The Taskforce representing the research community will have a significant influence on the implementation process. In order to fully involve the research community, it is proposed to organize a presentation event for all staff of the activities of the HRS4R Strategy and Action Plan, as well as a document presenting a summary of the HRS4R strategy.

A survey will be conducted annually to assess ICBP-NS community satisfaction with the HRS4R strategy. The results of the survey will be evaluated by the Monitoring Committee. Two years after the implementation of the Action Plan, an internal review of the HRS4R strategy will be carried out. The monitoring committee will review the C&C principles and the OTM-R policy and consider necessary adjustments if the stated objectives are not achieved. The level of implementation of the action plan will be checked, detecting possible non-conformities and indicating the proposed corrective actions. This report will be discussed and approved by the Coordination Committee and will be presented to the decision-making structures at the ICBP-NS level for final confirmation.

Make sure you also cover all the aspects highlighted in the checklist below, which you will need to describe in detail:

Note: Click on each question of the checklist to open the editor.

How will the implementation committee and/or steering group regularly oversee progress?*

Detailed description and duly justification (max. 500 words)

The Coordination Committee will periodically analyze the progress recorded regarding the deliverables included in the Action Plan, including the achievement of the indicators.

The Monitoring Committee will analyze and be responsible for following up on compliance with the calendar for achieving the indicators, the problems encountered during implementation, the associated risks and the measures to avoid them. It will periodically present to the Coordination Committee the status of the implementation of the actions, which will discuss with the relevant parties the results obtained at each stage in order to create favorable conditions for the successful implementation of the Action Plan.

How do you intend to involve the research community, your main stakeholders, in the implementation process?*

Detailed description and duly justification (max. 500 words)

The ICBP-NS research community will participate in the action plan implementation process by:

1. representatives of the research community, members of the coordination committee,
2. The working group, which participated in the initial phase, will continue to play its role as the main vehicle in the development of the process and will turn into a Monitoring Committee that will contribute to the implementation of the proposed actions and evaluate the implementation progress, for to identify in real time problems that may arise during implementation. The Monitoring Committee will report periodically to the Steering Committee on the progress of each action.
3. The Taskforce representing the research community will have a significant influence on the implementation process. In order to fully engage the research community, it is proposed to organize a presentation event for all staff of the activities of the HRS4R Strategy and Action Plan, as well as a document presenting a summary of the HRS4R strategy

How do you proceed with the alignment of organisational policies with the HRS4R? Make sure the HRS4R is recognized in the organisation’s research strategy, as the overarching HR policy. *

Detailed description and duly justification (max. 500 words)

The proposed actions will be the main vehicle to support the achievement of the objectives identified in the ICBP-NS Strategy and in the Management Plan (2023-2027).

The proposed action plan represents the transformation of the forecasts of the Research Human Resources Strategy component of IBPC-NS into concrete implementation phases over a multi-year period, with a supervisory structure and responsible persons assigned to carry out each action within the action plan as well as to achieve corresponding implicit strategic objectives.

The HRS4R will be fully integrated and recognize in the ICBP-NS research strategy which will be the subject of an information and awareness campaign during the 2 years of implementation of the Action Plan.

How will you ensure that the proposed actions are implemented?*

Detailed description and duly justification (max. 500 words)

The gap analysis and action plan were approved by the ICBP-NS decision-making leadership structure.

Therefore, the proposed action plan has institutional support at the highest level to be implemented.

The Coordination Committee and the Monitoring Committee include all the members of the ICBP-NS management, as well as key people from the administrative structure. Those responsible for the implementation of the actions are also people who are found in the 2 committees.

The implementation process will include regular consultation with relevant stakeholders.

Taskforce members who initially participated in the gap analysis will be invited to contribute to periodic revisions of the action plan.

They will continue to play an important role in annual informal operational monitoring and formal internal monitoring at the end of each cycle.

How will you monitor progress (timeline)?*

Detailed description and duly justification (max. 500 words)

The monitoring board will periodically evaluate the progress in the implementation of all phases according to the Gantt chart of the Action Plan, in order to identify as quickly as possible the problems that may arise during the implementation, milestones and deliverables, as well as indicators will be followed.

The Monitoring Committee will periodically report on the progress of each action to the Coordination Committee, which will be able to make decisions aimed at minimizing the impact of not fulfilling the assumed tasks and controlling related risks to eliminate any problems that may arise during implementation.

There will be organization:

- quarterly meetings of the Monitoring Commission involved in the implementation of the action plan
- half-yearly meetings of the Coordination Committee in which the members of the Monitoring Commission will also participate
- organized focus groups for researchers from the ICBP-NS scientific community, especially by consulting them twice a year to receive information and assess the changing perception of researchers on C&C implementation.

How will you measure progress (indicators) in view of the next assessment?*

Detailed description and duly justification (max. 500 words)

Indicators are set individually for all planned actions.

These indicators will be periodically evaluated by the Monitoring Committee, and the Coordination Committee will be responsible for making decisions to achieve the objectives set out by the proposed Action Plan.

Additional remarks/comments about the proposed implementation process: (max. 1000 words)

In order to fully comply with the Charter and the European Code for Researchers, it is necessary to make known to the IBPC-NS community, through the IBPC-NS website and the intranet, all documents relating to the Code of Ethics, existing/revised procedures and to disseminate the aspects of good practice regarding the principles of ethics, the research process and the management of research projects.
The principles of good research practice will be described in dedicated sections of the IBPC-NS website with guidelines to guide the researcher in making a research application and implementing a research project. Also, examples of best practices in research activity will be published, which will provide relevant information to support both the implementation of research activities and the dissemination of research results.
Researchers will be supported in their research activities and through access to the database and research results available at the IBPC-NS level.

To ensure full compliance with C&C principles and the OTM-R policy, it is necessary to develop a career development policy at IBPC-NS, which coherently outlines the institutional framework, activities, mechanisms and resources, respectively the structures responsible for planning, monitoring and evaluating career performance, integrating supervision and mentoring practices.
In order to boost outgoing and incoming mobilities, a procedure will be developed, and mobilities will be considered an advantage in the evaluation and selection process.

Excelența HR în cercetare

Plan de acțiune

Plan de acțiune

Numărul cazului

2022RO843264

Nume Organizație în curs de revizuire

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

Datele de contact ale organizației

Bogdan Petriceicu Hasdeu, nr. 8 , BUCURESTI, 050568, Romania

Data depunerii la Comisia Europeană

06.11.2024

1. Informații organizaționale

Vă rugăm să furnizați un număr limitat de cifre cheie pentru organizația dvs. Cifrele marcate * sunt obligatorii.

PERSONAL ȘI STUDENTI	FTE
Total cercetători = personal, bursieri, bursieri, doctorat. studenți cu normă întreagă sau cu jumătate de normă implicat în cercetare *	88
Dintre care sunt internaționali (adică naționalitate străină) *	9
Dintre care sunt finanțați extern (adică pentru cine organizația este organizația gazdă) *	0
Dintre care sunt femei *	67
Dintre care sunt stadiul R3 sau R4 = Cercetători cu un grad mare de autonomie, deținând de obicei statutul de cercetător principal sau profesor. *	23
Dintre care sunt stadiul R2 = în majoritatea organizațiilor corespunzătoare nivelului postdoctoral *	22
Dintre care sunt stadiul R1 = în majoritatea organizațiilor corespunzătoare nivelului de doctorat *	43
Numărul total de studenți (dacă este relevant) *	17
Numărul total de personal (inclusiv personal de conducere, administrativ, didactic și de cercetare) *	124

FINANȚAREA CERCETĂRII (cifre pentru cel mai recent an fiscal)	€
Bugetul anual total al organizației	4321815
Finanțare guvernamentală directă organizațională anuală (desemnată pentru cercetare)	2068340
Finanțare anuală competitivă din surse guvernamentale (desemnată pentru cercetare, obținută în competiție cu alte organizații – inclusiv finanțare UE)	2253475

FINANȚAREA CERCETĂRII (cifre pentru cel mai recent an fiscal)	€
Finanțare anuală din surse private, neguvernamentale, destinate cercetării	0

PROFIL ORGANIZAȚIONAL (o descriere foarte scurtă a organizației dvs., max. 100 de cuvinte)

ICBP-NS este un institut de cercetare biomedicală fondat în București-1979, România, care funcționează în cadrul Academiei Române, un Centru de Excelență al UE și membru al Rețelei UNESCO-Molecular Cell Biology Network. Programul de cercetare include studii fundamentale și preclinice în boli ale sistemului cardiovascular; strategii terapeutice în medicina de precizie. Cercetarea se desfășoară în cadrul a 8 compartimente interconectate, laboratoare centrale și o biobază modernă care deservește toate proiectele. ICBP-NS are o infrastructură de cercetare de ultimă oră și derulează un program de doctorat și este implicat în organizarea de cursuri, prelegeri, cursuri practice, simpozioane și congrese. Cercetătorii sunt implicați în proiecte multidisciplinare, în colaborare cu universități și clinici.

2. Punctele forte și punctele slabe ale practicii curente

Vă rugăm să furnizați o imagine de ansamblu asupra organizației în ceea ce privește punctele tari și punctele slabe actuale ale practicii curente, sub cele patru titluri tematice ale Cartei și Codului organizației dumneavoastră.

Notă: Faceți clic pe numele fiecăruia dintre cele patru titluri tematice ale Cartei și Codului pentru a deschide editorul și a furniza răspunsul dvs.

Aspecte etice și profesionale*

Puncte tari și puncte slabe (max. 800 de cuvinte)

Puncte forte

- Aspectele etice și profesionale sunt preponderent incluse în documentele instituționale.
- Strategia, Codul de etică și Regulamentul de organizare și funcționare ICBP-NS includ linii directoare privind inițierea, identificarea surselor și desfășurarea cercetării, metode de cercetare și etica cercetării, inclusiv evitarea plagiatului.

- La nivelul Institutului există documente aliniate la cerințele europene privind aspectele etice și profesionale:

- PO privind desfasurarea activitatilor de cercetare - metode si management al rezultatelor cercetarii Registrul
- managementului riscului.
- proceduri specifice de recrutare și selecție, precum și de evaluare a performanțelor personale pe baza unor criterii nediscriminatorii
  PO privind organizarea
- activităților de sănătate și securitate în muncă și protecția muncii.
- Planul de securitate, prevenire și protecție,
- Strategia pentru egalitatea de gen și Planul pentru egalitatea de gen. https://www.icbp.ro/static/en/en-research/
  gender_equality_strategy.html PO pentru
- operațiuni financiar-contabile include verificarea conformității și corectitudinii cheltuielilor la fiecare etapă de implementare a proiectului.

- În plus, Comisia de Control Intern Managerial, prin PO managementul riscului, monitorizează gestiunea financiară la nivelul institutului, duplicat de Procedura de Audit Public Intern derulată de Academia Română.

- Cercetătorii respectă practicile etice recunoscute și principiile etice corespunzătoare domeniilor în care practică activitatea de cercetare, în conformitate cu Codul de Etică ICBP-NS, în calitate de instituție cu finanțare
- publică, respectă regulile de transparență și supraveghere bugetară a finanțării publice.

- În ICBP-NS se asigură condiții optime de muncă, asigurându-se respectarea legislației naționale privind măsurile de protecție a muncii, sănătatea și securitatea în muncă și protecția datelor.
- ICBP-NS nu permite și nu încurajează nicio formă de discriminare.

- Departamentul de Resurse Umane al ICBP-NS este responsabil de respectarea condițiilor de muncă și de protecție a datelor și de confidențialitatea acestora.
- Contractele de proiect, din surse de finanțare europene și naționale, conțin obligații specifice cuprinse în Ghidul de finanțare și care sunt asumate de instituție, delegate sub coordonarea directorului de proiect, și aduse la cunoștința echipei de cercetare odată cu semnarea proiectului. contractele de muncă, atribuțiile și responsabilitățile fiind cuprinse în fișa postului fiecărui cercetător.

- Diseminarea rezultatelor cercetării se realizează:
- Conform obiectivului strategic al Institutului prin publicații în reviste științifice, aceasta reprezintă una dintre cele mai importante responsabilități ale cercetătorilor.
- În evenimente științifice și educaționale organizate de ICBP-NS La
- participarea la evenimente științifice, tehnice, de invenție și inovare naționale și internaționale, Pentru proiectele de cercetare
- implementate de cercetătorii ICBP-NS prin pagini web special create în cadrul proiectelor, pe pagina web a Instituției sau prin alte canale de comunicare.

Puncte slabe

- Codul de etică conține elemente care trebuie actualizate în conformitate cu ediția 2023 a Codului european de conduită pentru integritate în cercetare, inclusiv elemente legate de integritate.
- Deși la nivelul ICBP-NS sunt diseminate documentele privind principiile de etică și conduită profesională, comunicarea trebuie îmbunătățită în ceea ce privește conștientizarea și înțelegerea acestora și a principiilor Codului European de Conduită.

- Aspectele legate de responsabilitatea socio-economică pe care o presupune activitatea de cercetare sunt insuficient dezvoltate în documentele interne cu care operează IBPC-NS, de asemenea insuficient monitorizate, și diseminate la nivelul personalului de cercetare.

- Monitorizarea derulării mai multor proiecte în paralel care fac obiectul reglementărilor specifice liniilor de finanțare accesate este dificil de realizat fără un instrument electronic de management al proiectelor
- Nu există îndrumări interne concise cu privire la reglementările interne cu privire la implicațiile/obligațiile cercetătorului/instituției/ finanțatorului cu privire la rezultatele obținute în contextul diferitelor tipuri de finanțare/contracte de servicii pentru activități de cercetare și inovare

- Finanțare insuficientă pentru accesul la toate publicațiile științifice, la materialele consumabile necesare derulării tuturor proiectelor de cercetare.
- Nu există un plan de comunicare integrat pentru diseminarea rezultatelor cercetării efectuate la nivelul institut
- nu există un Regulament general privind protecția datelor - GDPR
- Procedurile nu sunt actualizate în ceea ce privește criteriile de gen

- sistemul de backup pentru stocarea datelor de cercetare este depășit, inclusiv sistemele de protecție a datelor care necesită actualizări
- Site-ul web IBPC-NS nu are o interfață ușor de utilizat, cu informații învechite și fără o platformă care
  con ine date structurate referitoare la domeniile de cercetare abordate
- informațiile financiare publice nu sunt actualizate pe pagina web existentă.

Recrutare si selectie*

Puncte tari și puncte slabe (max. 800 de cuvinte)

Puncte forte

- ICBP-NS are ca obiectiv strategic atragerea tinerilor cercetători, doctoranzi și postdoctoranzi.
- Ocuparea posturilor se face prin concurs public, aplicând reglementările interne ICBP-NS, elaborate în conformitate cu legislația națională care respectă principiile transparenței, nediscriminării, egalității de șanse și standardelor de calitate specifice nivelului postului.
- Procesul de recrutare și selecție a personalului în ICBP-NS este diferențiat în funcție de tipul de post și de postul din ierarhia postului.
- Îndrumarea concurenților și supravegherea procesului de recrutare, selecție și promovare a cercetătorilor este o sarcină pe care o îndeplinește instituția.
- Toate anunțurile pentru locurile de muncă vacante de cercetare sunt întocmite conform prevederilor legale românești în vigoare și publicate pe site-ul instituțional (https://www.icbp.ro/news/news.php?lang=en), pe euraxess.gov.ro si pe jobs.research.gov.ro Aplicatia include conditii specifice pentru potentialii candidati
- ceea ce inseamna ca doar cercetatorii potriviti pot indeplini conditiile de recrutare.
- Constituirea Comisiei de Evaluare se bazează pe criterii de merit academic și de recunoaștere, membrii Comisiei participând la dezbateri formale și informale, inclusiv în ceea ce privește desfășurarea procesului de evaluare a candidaților.
- Regulamentul intern aplicat pentru ocuparea posturilor vacante prevede diferențierea componenței comisiilor și a practicilor utilizate pentru selecție, în funcție de specificul postului vacant.
- După finalizarea procesului de selecție, fiecare candidat este informat despre rezultatele selecției prin e-mail/telefon și pe site-ul ICBP-NS.
- În evaluarea candidaților, ICBP-NS are o abordare flexibilă în ceea ce privește experiența și vârsta de acces pe un post, variațiile în activitatea profesională a candidaților nu sunt penalizate, experiența de mobilitate este un plus în evaluarea candidaților, acoperă și profesionale, formale și non-formale în măsura în care sunt relevante pentru specificul posturilor vizate.

Puncte slabe

- Procesul de recrutare este condiționat de aprobarea posturilor din organigrama și a alocărilor bugetare pentru posturile permanente.

- Chiar dacă principiile Politicii de recrutare deschise, transparente și bazate pe merit sunt incluse în majoritatea procedurilor și practicilor de recrutare, promovare, selecție pentru toate tipurile de posturi specifice posturilor din ICBP-NS, reformulări sunt necesare pentru a fi în deplin acord cu cerințele OTM-R.
- Politica de recrutare deschisă, transparentă și bazată pe merit nu este finalizată și publicată pe site-ul web ICBP-NS.
- Este necesară îndeplinirea unor atribuții administrative ale Departamentului de Resurse Umane corespunzătoare cerințelor OTM-R.

- Chiar dacă anun urile sunt publicate în toate mediile online specifice cercetării, de multe ori este necesară republicarea anun urilor, fiind dificil să recrutezi candida i.
- Reclamele nu descriu în detaliu condițiile de muncă și perspectivele de dezvoltare a carierei.
- Pentru condițiile specifice posturilor din afara organigramei, concursuri organizate pentru posturi incluse în proiectele cu finanțare nerambursabilă, nu se organizează pregătire prealabilă a membrilor Comisiei.
- Componenta comisiilor de evaluare include rareori experți din afara membrilor Academiei Române și din sectorul privat având în vedere natura activității de cercetare ICBP-NS, respectiv cercetare fundamentală.

- Criteriile actuale nu includ aspecte legate de strângerea de fonduri, responsabilitatea socio-economică, managementul cercetării.
- Datorită finanțării din diferite surse (proiecte, programe, burse) nu există criterii uniforme de selecție a personalului postdoctoral.

- Din lipsa reglementărilor legale, nu se poate stabili durata maximă a numirii/activității postdoctorale, cu excepția celor stabilite prin programe/proiecte.

Conditii de lucru*

Puncte tari și puncte slabe (max. 800 de cuvinte)

Puncte forte

- Cercetătorii ICBP-NS trec anual prin procesul de evaluare a performanței, pe baza criteriilor cuprinse în Procedura Interna de Evaluare a Performanței, prin stabilirea unor criterii cantitative și calitative specifice nivelului de carieră și aliniate la standardele internaționale.

- ICBP-NS dispune de infrastructuri de cercetare performante, laboratoare, echipamente moderne si are in faza de implementare si alte investitii noi pentru activitatea de cercetare.
- ICBP-NS asigură colaborarea de la distanță în cadrul rețelelor de cercetare.
- Contractul individual de munca practicat de ICBP-NS este creat in interesul cercetatorului, conditiile legate de protectia si securitatea in munca sunt asigurate asa cum sunt reglementate in legislatia nationala si transpuse in PO privind organizarea securitatii si sanatatii in munca. activitatea muncii si protectia muncii.
- În cadrul ICBP-NS sunt respectate principiile privind egalitatea de șanse, nediscriminarea, atât în ceea ce privește accesul persoanelor cu dizabilități, cât și conform declarației de gen.
- ICBP-NS respectă în toate acțiunile pe care le întreprinde principiile legate de șanse egale și egalitate de tratament în funcție de numărul de femei și bărbați.
- Contractele pentru personalul de cercetare pe perioadă nedeterminată sunt similare cu contractele personalului angajat în instituțiile publice și cu cele ale personalului permanent.
- Angajații ICBP-NS au facilități legate de programul de lucru: posibilitate de lucru cu jumătate de normă, program flexibil, facilități pentru tinerii părinți.

- La nivel national, cercetatorii au facilitati fiscale pentru activitatile de CD desfasurate in cadrul proiectelor, prin aplicarea de tarife aliniate la nivel european.
- În ICBP-NS, este asigurată stabilitatea și continuitatea angajării pentru cercetători.
- În cadrul ICBP-NS există flexibilitate în ceea ce privește posibilitățile de angajare a cercetătorilor pe proiecte de cercetare, ceea ce stimulează participarea la proiecte de cercetare.
- Principala sursă de finanțare pentru ICBP-NS este accesul la proiecte de cercetare cu finanțare nerambursabilă, completate cu fonduri de la bugetul de stat alocate prin intermediul Academiei Române. și fondurile structurale.
-

- Este încurajat să participe la mobilități de scurtă durată pentru deplasări la conferințe, workshop-uri, grupuri de lucru sau coordonarea activităților de doctoranzi în co-supervizare.
- În ICBP-NS, cercetătorii sunt recunoscuți ca autori și co-autori independenți, în conformitate cu practica internațională în domeniu.

- Soluționarea plângerilor referitoare la probleme etice revine Comisiei de Etică.
- Conflictele privind drepturile și condițiile de muncă pot fi soluționate și la nivelul Comisiei de disciplină.
- Cercetătorii sunt reprezentați în organe consultative și decizionale, unde pot apăra și promova nu numai interesele personale, ci și pe cele colective.
- Personalul permanent de cercetare alege reprezentanții în comisiile institutului.

Puncte slabe

- Evaluarea performanțelor cercetătorilor se face în mod tradițional, fără a se asigura transparența deplină.
- Deși Managementul și practicile specifice activităților de cercetare sunt bine organizate, acestea nu au o largă diseminare și o metodologie specifică care să includă îndrumarea, în primul rând a tinerilor cercetători, pentru a se acomoda încă de la începutul carierei cu înțelegerea și abordarea corectă a libertății. de cercetare.
- Infrastructura ICBP-NS necesită o actualizare parțial asigurată de proiectele în derulare, dar care nu acoperă în totalitate nevoile identificate

- Deși există reguli, nu există nicio procedură privind lucrul de la distanță în regim hibrid.
- La nivelul ICBP-NS, Comitetul de Control Intern Managerial trebuie să fie actualizat astfel încât să poată urmări îndeaproape evoluția cercetătorilor și să identifice în cel mai scurt timp posibil erorile care apar în ceea ce privește remunerarea angajaților, astfel încât să nu apară discrepanțe nejustificate între cei care au aceeasi pozitie si sa gaseasca cele mai avantajoase solutii pentru a crea cele mai avantajoase oferte pentru a stimula tinerii cercetatori.
- Participarea la activități de formare continuă se decide individual, nefăcând parte dintr-o strategie de formare aplicabilă unitar la nivelul institutului.
- Este nevoie de o strategie de mobilitate mai eficientă care să cuprindă toate nevoile cercetătorilor și sursele de accesare a fondurilor pentru mobilitate, informații care trebuie actualizate și în Regulamentul de Organizare și Funcționare al ICBP-NS Nu este prevăzută pentru
- ocuparea unui post de cercetare. sau pentru avansarea în carieră, elaborarea unui plan de carieră, care devine efectiv după ocuparea postului.

- Nu există un mecanism de recompensare financiară pentru cercetătorii inventatori, dar activitatea acestora este recunoscută în rapoartele anuale de activitate și este susținută participarea la evenimentele organizate în țară sau în străinătate.
- La nivelul ICBP-NS nu există sesiuni de formare în colaborare.
- Rezultatele activității organelor de decizie, comisiilor/organelor de consultare, informații nu sunt popularizate la nivelul comunității ICBP-NS.

Antrenament și dezvoltare*

Puncte tari și puncte slabe (max. 800 de cuvinte)

Puncte forte

- ICBP-NS participă la pregătirea doctoranzilor, la nivelul institutului fiind un număr de 7 coordonatori de doctorat.
- Studiile de doctorat se desfășoară pe baza Procedurii Operaționale privind organizarea programelor de doctorat care au ca scop și susținerea tezei. Fiecare doctorand beneficiază de îndrumare și îndrumare din partea coordonatorului sau supervizorului.
- Doctoranzii, studenții postdoctoranzi, asistenții de cercetare, cercetătorii începători ai ICBP-NS sunt integrați în echipele de cercetare din cadrul departamentelor, pe proiecte specifice și sunt îndrumați pe parcursul activității de către cercetători superiori și coordonatorii de proiecte.
- Tinerii cercetători participă la cursuri de dezvoltare a abilităților de cercetare, de sprijinire a abordărilor inovatoare în învățământul superior și de stimulare a atitudinilor și abilităților, respectiv pentru creșterea capacității științifice a echipelor de cercetare prin colaborări internaționale.
- ICBP-NS are o preocupare constantă de a dezvolta abilitățile de cercetare și transversale pentru a asigura succesul și performanța în carieră.
- Complementar activităților de cercetare asistată, cursurile de formare profesională, doctoranzi, postdoctoranzi și cercetători debutanți de la IBPC-NS beneficiază de activități de consiliere și orientare în carieră.
- La nivelul ICBP-NS, cercetătorii au posibilitatea de a participa la mai multe programe de dezvoltare a carierei de cercetare, finanțate prin fonduri proprii, naționale și structurale.
- Este încurajat să participe la mobilități de scurtă durată pentru deplasări la conferințe, workshop-uri, grupuri de lucru sau coordonarea activităților de doctoranzi în co-supervizare.
- ICBP-NS organizează workshop-uri, cursuri intensive și prelegeri cu invitați români sau străini pentru a dezvolta anumite componente ale activității de cercetare.
- Membrii Consiliului Științific au experiența necesară pentru a îndruma cercetarea, au disponibilitatea de timp, cunoștințe, experiență, competență și angajament pentru a oferi sprijin adecvat tinerilor cercetători.

Puncte slabe

- Chiar dacă la nivelul strategiei ICBP-NS atragerea tinerilor cercetători este un obiectiv principal, institutul trebuie să dezvolte încă o Politică de Dezvoltare a Carierei în care să fie menționat un parcurs de formare personalizat în raport cu nivelul de carieră, și care să propună o abordare strategică. la activită ile de mentorat i supraveghere.

- Activitățile de supraveghere nu se desfășoară sistematic în absența unui cadru de reglementare pentru activitatea supervizorului și a mentoretului.
- Participarea la activități de formare continuă se decide individual, nefăcând parte dintr-o strategie de formare aplicabilă unitar la nivelul institutului.
- Nu există un cadru metodologic de organizare a activității cercetătorilor care să-i sprijine în dezvoltarea carierei.
- Nu este prevăzută pentru ocuparea unui post de cercetare sau pentru avansarea în carieră, elaborarea unui plan de carieră, care devine efectiv după ocuparea postului.

3. Acțiuni

Planul de acțiune și strategia HRS4R trebuie publicate într-o locație ușor accesibilă a site-ului web al organizației.

Vă rugăm să furnizați linkul către paginile web dedicate Planului de acțiune/strategiei de resurse umane ale organizației:

https://www.icbp.ro/static/en/en-careers/otmr_strategy_hrs4r.html (https://www.icbp.ro/static/en/en-careers/otmr_strategy_hrs4r.html)

Vă rugăm să completați lista tuturor acțiunilor individuale care trebuie întreprinse în HRS4R al organizației dumneavoastră pentru a aborda punctele slabe sau punctele forte identificate în Analiza decalajelor. Acțiunile enumerate ar trebui să fie concise, dar suficient de detaliate pentru ca evaluatorii să evalueze nivelul de ambiție, implicare și procesul de implementare așteptat. Instituția ar trebui să se străduiască să ofere un plan detaliat, nu doar o enumerare a acțiunilor.

Notă: Alegeți unul sau mai multe dintre principiile preluate automat din Analiza GAP cu evaluările de implementare ale acestora.

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 1		
Actualizarea și modernizarea site-ului web ICBP-NS pentru a crea o interfață ușor de utilizat pentru informarea publicului despre progresul cercetării	Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/semestrul anului)
	(--) 6. Responsabilitate	
	(-/+) 8. Diseminarea, exploatarea rezultatelor	Y2/S1
	(-/+) 9. Angajarea publicului	
	Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
	Lucru Grup/Taskforce	- site web cu informații relevante pentru grupurile țintă vizate de rezultatele cercetării efectuate de ICBP-NS (8,9) - site web cu link-uri actualizate către toate proiectele realizate de ICBP-NS (8) - site web cu informații financiare (6) - Nu. vizitatorii site-ului web

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 2

Actualizarea spațiului dedicat de pe site-ul ICBP-NS, în secțiunea Cercetare, cu informații relevante despre oportunitățile de cercetare

Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/ semestrul anului)
(+/-) 1. Cercetează libertatea (+/-) 4. Atitudine profesională (-/+) 8. Diseminarea, exploatarea rezultatelor (+/-) 23. Mediu de cercetare	Y1/S2

Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
Direcție Comitet Lucru Grup/Taskforce (TF)	- site-ul web cu informații relevante cu privire la oportunități legate de libertăți și oportunități pentru activitatea de cercetare în domeniul Secțiunea „Cercetare”.

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 3		
Crearea unui spațiu dedicat pe site-ul ICBP-NS privind etica și proprietatea intelectuală	Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/semestrul anului)
	(+/-) 2. Principii etice (+/-) 5. Obligații contractuale și legale (+/-) 31. Drepturi de proprietate intelectuală	Y1/S2
	Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
	Direcție Comitet Etica Comitet	- site-ul web cu informații relevante privind principiile etice și drepturile de proprietate intelectuală asupra Secțiunea „Cercetare” (2,5, 31); - De operare Regulamentul Comitetului de etică (2)

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 4		
Dezvoltarea facilitatilor si beneficiilor prin intermediul retelei intranet ICBP-NS si promovarea acesteia in randul cercetatorilor institutului	Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/semestrul anului)
	(+/-) 23. Mediu de cercetare (+/-) 34. Reclamații/ contestații (+/-) 35. Participarea la organele de decizie	Y1/S2

Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
Internul management Control Comitet Lucru Grup/TF	- Intranet pentru lucru la distanță (23) - Informații privind rețeaua intranet privind activitățile comitetelor/ structurilor și reglementărilor/instrucțiunilor care descriu responsabilitățile acestora structurate pe domeniile operaționale ale institutului: educație, cercetare, inovare, resurse umane, capacitate administrativă. (34,35)

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 5		
Propuneri de actualizare a reglementărilor în domeniul achizițiilor publice de consumabile specifice activităților de cercetare	Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/ semestrul anului)
	(+/-) 1. Cercetează libertatea	Y1/S2

Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
Lucru Grup/TF	- Memorandum privind flexibilitatea achizițiilor publice în domeniul cercetării. - Numărul de entități cărora le este transmis memoriul - Feedback de la autorități

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 6

Actualizarea procedurilor existente la nivelul ICBP-NS și alinierea acestora la standardele HRS4R

Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/semestrul anului)
(-/+) 3. Responsabilitate profesională	Y1/S2
(--) 6. Responsabilitate	
(+/-) 24. Conditii de munca	
(+/-) 25. Stabilitatea și permanența locului de muncă	
(+/-) 26. Finanțare și salarii	

Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
Internul management Control Comitet Direcție Comitet	- Sistem Integrat de Cercetare și Operațiuni Administrative (RAO) (6) - Proceduri și reglementări actualizate (3,6,26) - Dezvoltarea și implementarea unei proceduri privind condițiile hibride și de lucru la distanță/ dezvoltarea capacității de lucru la distanță și munca la domiciliu. (24,25)

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 7		
Actualizarea procedurilor de selecție și recrutare la Nivelul ICBP-NS pentru a îmbunătăți performanța institutului prin crearea unei zone mai diverse pentru recrutarea cercetătorilor	Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/semestrul anului)
	(-/+) 16. Meritul de judecată (Cod) (+/-) 17. Variații în ordinea cronologică a CV-urilor (Cod) (-/+) 18. Recunoașterea experienței de mobilitate (Cod) (+/-) 19. Recunoașterea calificărilor (Cod)	Y1/S2
	Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
	Lucru Grup/TF	- Procedura operațională de selecție a personalului cu criterii legate de strângerea de fonduri, responsabilitatea socio-economică și managementul cercetării. (16,17) - Procedura operațională de selecție a personalului cu criterii legate de ocuparea posturilor de cercetare vacante, permanente sau temporare, în cadrul sau în afara organigramei, cu referire distinctă la experiența de mobilitate și recunoașterea calificărilor profesionale, formale și non-formale . (18,19)

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 8		
Actualizarea procedurilor interne de evaluare a performanței folosind metode/instrumente moderne	Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/ semestrul anului)
	(+/-) 11. Sistemele de evaluare/apreciere (+/-) 22. Recunoașterea profesiei	Y1/S2
	Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
	Științific Consiliu Lucru Grup/TF	- Procedura operațională actualizată pentru evaluarea performanței personalului, inclusiv toate nivelurile profesionale (11, 22) - Introducerea de metode/instrumente moderne pentru îmbunătățirea sistemelor de îmbunătățire a performanței (11)

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 9

Elaborarea și implementarea reglementărilor interne privind condițiile de lucru la distanță și capacitatea digitală instituțională de lucru la distanță

Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/ semestrul anului)
(+/-) 23. Mediu de cercetare	Y2/S1

Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
Lucru Grup/TF	Regulamentul privind condițiile de muncă la distanță și dezvoltarea capacității informaționale instituționale pentru munca la distanță

Acțiunea 10

Crearea unui regulament privind mobilitatea personalului și angajarea partenerilor străini pentru colaborare prin parteneriate în implementarea proiectelor și schimbul de know-how și experiență

Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/ semestrul anului)
(+/-) 29. Valoarea mobilității	Y2/S1

Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
Științific Consiliu Direcție Comitet	- Regulamentul intern actualizat care detaliază mobilitatea personalului și recrutarea personalului străin. - Numărul de schimburi de experiență și know-how cu parteneri internaționali

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 11

Actualizarea Codului de Etică și Proceduri privind criteriile de gen pentru a reglementa aspecte precum criteriile de gen, protecția datelor, integritatea și moralitatea cercetătorilor atât în interiorul, cât și în afara institutului.

Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/semestrul anului)
(+/-) 2. Principii etice	
(+/-) 7. Bună practică în cercetare	Y1/S2
(+/-) 10. Nediscriminare	

Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
Etica Comitet Direcție Comitet	- Codul de etică actualizat care încorporează elemente legate de integritate (2) - Protecția generală a datelor Politica de reglementare (GDPR) (7) - Procedura actualizată privind criteriile de gen (10)

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 12

Formarea cercetătorilor la nivelul întregului institut pentru implementarea proiectelor, valorificarea rezultatelor și stabilirea unui sistem electronic de management al proiectelor pentru a facilita implementarea acestora

Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/semestrul anului)
(+/-) 4. Atitudine profesională	
(+/-) 5. Obligații contractuale și legale	Y2/S1
(--) 6. Responsabilitate	

Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
Direcție Comitet Lucru Grup/TF	- Procedura generală de implementare a proiectelor, inclusiv aspectele de valorificare a rezultatelor cercetării în beneficiul societății. (4,5) - Sistem electronic de management al proiectelor pentru a funcționa pe intranet. (4,6) - Ghid privind reglementările privind implicațiile/obligațiile cercetătorului/instituției/finanțatorului cu privire la rezultatele obținute în contextul diferitelor tipuri de finanțare/contracte de servicii pentru activități de cercetare și inovare. (5)

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 13		
Dezvoltarea capacității cercetătorilor de la ICBP-NS de a asigura evitarea plagiatului și a autoplagiatului și încurajarea publicării de articole științifice în reviste/publicații de specialitate	Principiul(principiile) GAP (-/+) 3. Responsabilitate profesională (+/-) 5. Obligații contractuale și legale	Calendar (cel puțin pe trimestrul/ semestrul anului) Y1/S2
	Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
	Științific Consiliu	Program de combatere a plagiatului și autoplagiatului pe intranet

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 14		
Valorificarea rezultatelor cercetării prin îmbunătățirea comunicării, diseminarea know-how-ului și conștientizarea proprietății intelectuale, încurajând cercetătorii să participe activ la aceste eforturi	Principiul(principiile) GAP (+/-) 5. Obligații contractuale și legale (-/+) 8. Diseminarea, exploatarea rezultatelor	Calendar (cel puțin pe trimestrul/ semestrul anului) Y2/S2
	Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
	Direcție Comitet	- Plan de comunicare cu identificarea mijloacelor și a grupurilor țintă pentru a maximiza valorificarea rezultatelor cercetării. (8) - Fișe actualizate de post pentru cercetători, inclusiv aspecte legate de know-how și proprietate intelectuală. (5)

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 15		
Stabilirea de parteneriate pentru a facilita cercetarea științifică, precum și valorificarea rezultatelor acesteia	Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/ semestrul anului)
	(-/+) 8. Diseminarea, exploatarea rezultatelor	Y2/S2

Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
Științific Consiliu	Numărul de parteneriate pentru integrarea ICBP-NS în clustere de inovare și hub-uri/rețele/teme pentru sporirea valorificării rezultatelor cercetării.

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 16		
Consolidarea operațiunilor de resurse umane la nivelul ICBP-NS în conformitate cu Politica OTM-R	Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/semestrul anului)
	(-/+) 12. Recrutare (+/-) 13. Recrutare (Cod) (+/-) 14. Selectare (Cod) (+/-) 15. Transparență (Cod)	Y2/S1
	Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
	Direcție Comitet Lucru Grup/TF	- Document de politică OTM-R - Site web care conține documentul de politică OTM-R - Ghid intern pentru implementarea politicii OTM-R - Procedura Operațională de recrutare/selectare actualizată în conformitate cu politica OTM-R. - Fișa postului actualizată pentru HR responsabil cu privire la implementarea politicii OTM-R

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 17		
Crearea unui formular de cerere online pentru a simplifica procesul pentru persoanele interesate care aplică pentru posturi vacante la ICBP-NS	Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/semestrul anului)
	(+/-) 13. Recrutare (Cod) (+/-) 14. Selectare (Cod)	Y1/S2
	Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
	Lucru Grup/TF	set de instrumente pentru aplicații online (13,14)

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 18		
Îmbunătățirea procesului de evaluare a performanței și de dezvoltare a carierei	Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/ semestrul anului)
	(+/-) 11. Sisteme de evaluare/apreciere	
	(+/-) 13. Recrutare (Cod)	
	(+/-) 14. Selectare (Cod)	Y2/S2
	(+/-) 15. Transparență (Cod)	
	(+/-) 20. Vechime (Cod)	

Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
Științific Consiliu	-Setul de instrumente de aplicație online pentru autoevaluarea performanței (11) - Anunțuri de recrutare completate cu informații scrise în scrisoarea de intenție privind condițiile de muncă și perspectivele de dezvoltare a carierei. (13,14,15) - Încorporarea în chestionarul de probă scrisă a aspectelor legate de viziunea candidatului asupra dezvoltării profesionale. (20)

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 19		
Educarea cercetătorilor în domeniul eticii cercetării și conștientizarea cu privire la responsabilitatea socio-economică	Principiul(principiile) GAP (+/-) 1. Cercetează libertatea (+/-) 2. Principii etice (-/+) 3. Responsabilitate profesională (--) 6. Responsabilitate	Calendar (cel puțin pe trimestrul/semestrul anului) Y2/S2
	Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
	Direcție Comitet Etica Comitet	- Sesiuni de instruire semestriale privind etica cercetării, destinate studenților doctoranzi și tinerilor cercetători. (1) - Sesiuni de formare semestriale menite să crească gradul de conștientizare a personalului cu privire la responsabilitatea socială și economică. (3,6) - Cursuri anuale de etică și integritate. (2)

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 20

Instruirea personalului privind conditiile de securitate in munca si prevenirea riscurilor

Principiul(principiile) GAP

(+/-) 7. Bună practică în cercetare

Calendar (cel puțin pe trimestrul/ semestrul anului)

Y2/S1

Responsabil

Unitate

Lucru Grup/TF Ocupațională Sănătate și Siguranță Comitet

Indicator(i)/țintă(i)

Sesiuni anuale de instruire privind condițiile de securitate a muncii și prevenirea riscurilor.

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 21		
Crearea de oportunități de dezvoltare a carierei pentru studenți	Principiul(principiile) GAP	Timpul (cel puțin pe an trimestru/semestru)
	(+/-) 13. Recrutare (Cod) (+/-) 14. Selectare (Cod)	Y2/S2
	Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
	Lucru Grup/TF	- Evenimente anuale Open House - Număr de fluturași distribuite în mediul academic - Număr de tinerii interesați să aplice pentru locuri de muncă la ICBP-NS

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 22

Promovarea ICBP-NS pentru a atrage tineri cercetători prin participarea la evenimente științifice, evenimente universitare și alte adunări similare

Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/ semestrul anului)
(+/-) 13. Recrutare (Cod) (+/-) 14. Selectare (Cod)	Y2/S2

Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
Direcție Comitet Lucru Grup/TF	- Numărul de participări la târguri de locuri de muncă dedicate cercetătorilor - Numărul de noi colaborări - Numărul de vizite pe site-ul ICBP-NS - Număr a tinerilor interesa i

Acțiunea 23

Dezvoltarea de programe de mobilitate pentru cercetare

Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/ semestrul anului)
(+/-) 21. Programări postdoctorale (Cod)	Y2/S1

Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
Științific Consiliu	Numărul de programe de mobilitate pentru tinerii postdoctorali cercetători

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 24

Integrarea tinerilor cercetători în echipele de cercetare ICBP-NS

Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/ semestrul anului)
(+/-) 21. Programări postdoctorale (Cod)	Y2/S2

Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
Direcție Comitet Lucru Grup/TF	- Înființarea unui Club Tinerilor Cercetători - Numărul de activități generate în cadrul Clubului

Acțiunea 25

Îndrumarea și monitorizarea integrării tinerilor indivizi în activitățile Institutului

Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/ semestrul anului)
(-/+) 3. Responsabilitate profesională	Y2/S1

Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
Direcție Comitet Lucru Grup/TF	- Fișe de orientare pentru tinerii cercetători - Numărul de tineri cercetători

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 26		
Actualizarea progresului științific în domenii specifice de cunoaștere legate de activitățile de cercetare desfășurate la toate Departamentele ICBP-NS, inclusiv protecția și valorificarea drepturilor de proprietate intelectuală	Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/ semestrul anului)
	(+/-) 31. Drepturi de proprietate intelectuală (-/+) 36. Relația cu supraveghetorii (-/+) 39. Accesul la formare în cercetare și dezvoltare continuă	Y2/S2
	Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
	Științific Consiliu	- Numărul de seminarii științifice care vizează actualizarea tinerilor cercetători cu privire la descoperirile științifice din cadrul departamentelor ICBP-NS, axându-se în special pe protecția și valorificarea drepturilor de proprietate intelectuală, precum și îmbunătățirea abilităților și competențelor tinerilor cercetători pentru a îmbunătăți capacitatea de angajare. - Numărul de tineri cercetători instruiți

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 27		
Creșterea capacității mentorilor în formarea tinerilor cercetători	Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/ semestrul anului)
	(-/+) 30. Acces la consiliere în carieră (+/-) 37. Supraveghere și sarcini manageriale	Y1/S2

Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
Direcție Comitet Lucru Grup/TF	- Numărul de sesiuni de formare a mentorilor (37) - Numărul de mentori care oferă formare și dezvoltare a carierei tinerilor cercetători - Număr de parteneriate cu părțile interesate (30)

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 28		
Dezvoltarea unei strategii de mentorat și dezvoltare a carierei	Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/semestrul anului)
	(+/-) 29. Valoarea mobilității	
	(-/+) 36. Relația cu supraveghetorii	Y2/S1
	(+/-) 37. Supraveghere și sarcini manageriale	

Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
Direcție Comitet Lucru Grup/TF	- Strategia de mentorat pentru dezvoltarea carierei (37) - Regulamentul intern actualizat care detaliază mobilitățile (29) - Numărul de cercetători supravegheați prin activități de mentorat (36,37) - Numărul de tineri cercetători care beneficiază de consiliere pentru dezvoltarea carierei (36)

ACȚIUNI PROPUSE

Acțiunea 29

Facilitarea dezvoltării și evoluției cercetătorilor în domeniul cercetării prin crearea de instrumente care să-și stimuleze eforturile de cercetare

Principiul(principiile) GAP	Calendar (cel puțin pe trimestrul/ semestrul anului)
(+/-) 28. Dezvoltarea carierei (-/+) 38. Dezvoltare profesională continuă (-/+) 39. Accesul la formare în cercetare și dezvoltare continuă (+/-) 40. Supraveghere	Y2/S1

Responsabil Unitate	Indicator(i)/țintă(i)
Direcție Comitet Lucru Grup/TF	- Dezvoltarea unei politici de dezvoltare a carierei (28) - Sistem de evaluare și revizuire a progresului în dezvoltarea carierei (38,39,40) - Numărul de cercetători care avansează în cariera lor

Principii neselectate:

(++) 27. Echilibrul de gen (+/-) 32. Coautor (++) 33. Predare

Stabilirea unei Politici Deschise de Recrutare este un element cheie în strategia HRS4R. Vă rugăm să indicați, de asemenea, cum va folosi organizația dvs. Setul de instrumente de recrutare deschis, transparent și bazat pe merit și cum intenționați să implementați/puneți în aplicare principiile recrutării deschise, transparente și bazate pe merit. Deși pot exista unele suprapuneri cu o serie de acțiuni enumerate mai sus, vă rugăm să furnizați a

scurt comentariu care demonstrează această implementare. Dacă este cazul, vă rugăm să faceți legătura între lista de verificare OTM-R și planul de acțiune general. (max. 1000 de cuvinte) *

Procesul de recrutare și selecție a cercetătorilor în ICBP-NS respectă principiile unei recrutări deschise, transparente, bazate pe merit stabilite prin reglementările naționale care au fost transpuse în Procedurile de recrutare și selecție a personalului pentru posturile vacante sau temporar vacante din cadrul ICBP-NS. și în afara organigramei.

Procedurile vor fi revizuite în conformitate cu cerințele specificate în lista de verificare OTM-R.

Procedurile de recrutare și selectare a personalului pentru posturi vacante sau temporar vacante din cadrul și din afara organigramei, cuprind condiții specifice pentru personalul auxiliar de cercetare tehnică și pentru personalul administrativ, pentru personalul recrutat pe proiecte de cercetare și respectă principiile OTM-R, denumite linii directoare interne.

Aspectele relevante vor fi publicate pe site-ul ICBP-NS.

Pentru adoptarea unei astfel de implementări care să prevadă îndeplinirea obiectivelor stabilite în Lista de verificare OTM-R, din structura administrativă a ICBP-NS va fi desemnată o persoană, respectiv managerul resurselor umane care va avea responsabilitatea generală pentru realizarea si implementarea procedurilor OTM-R, inclusiv asigurarea bunei functionari a ghidurilor interne. Acesta va fi asistat pe parcursul celor 2 ani de implementare a Planului de Acțiuni propus de către reprezentanții Comitetului Director, ai Grupului de Lucru, precum și ai Părților Interesate, atât în ceea ce privește implementarea acțiunilor propuse, cât și în ceea ce privește respectarea prevederilor propuse. calendar.

Dacă organizația dvs. are deja o strategie de recrutare care implementează principiile recrutării deschise, transparente și bazate pe merit, vă rugăm să furnizați linkul web unde această strategie poate fi găsită pe site-ul web al organizației dvs.:

URL:

https://www.icbp.ro/resources/static_files/Grants/cardiopro/Proiectarea%20SCIM%20si%20implementarea%20la%20nivelul%20Institutului.pdf (https://www.icbp.ro/resources/static_files/Grants/ cardiopro/Proiectarea%20SCIM%20si%20implementarea%20la%20nivelul%20Institutului.pdf)

4. Implementare

Prezentare generală a procesului general de implementare așteptat al planului de acțiune: (max. 1000 de cuvinte)

Analiza reglementărilor și practicilor interne din ICBP-NS cu privire la îndeplinirea celor 40 de principii ale C&C a evidențiat aspectele din diferite domenii de activitate care trebuie îmbunătățite.

Rezumând aceste aspecte, acestea au fost grupate în 10 categorii care sintetizează acțiunile care vor fi întreprinse pentru îndeplinirea principiilor C&C:

1. Dezvoltarea și actualizarea procedurilor existente pentru a se alinia cu HRS4R 2.
Elaborarea liniilor directoare pentru a sprijini implementarea procedurilor 3. Crearea unui
spațiu dedicat pe site-ul ICBP-NS, secțiunea Cercetare, cu informații relevante privind etica și profesională
aspecte
4. Dezvoltarea de instrumente moderne de tip aplicație pe site-ul ICBP-NS 5.
Organizarea de sesiuni de instruire
6. Responsabilități suplimentare legate de managementul carierei multidimensionale cu rol în implementarea strategiei IF
aliniat la Politica OTM-R 7.
Acțiuni legate de informare, diseminare și conștientizare 8. Promovarea
schimbului de experiență prin mobilitate 9. Actualizarea
sistemului de backup și stocarea informațiilor/datelor, inclusiv soluții de sisteme de protecție și securitate a datelor 10. Propuneri către
asigurarea flexibilității achizițiilor publice în domeniul cercetării

Acțiunile propuse vor fi vehiculul principal de sprijinire a atingerii obiectivelor identificate în Strategia și Planul de Management ICBP-NS (2023-2027).

Planul de acțiune propus reprezintă transformarea previziunilor componentei Strategiei de Resurse Umane de Cercetare a ICBP-NS în faze concrete de implementare pe o perioadă multianuală, cu o structură de supraveghere și persoane responsabile desemnate să desfășoare fiecare acțiune în cadrul planului de acțiune ca precum i pentru atingerea obiectivelor strategice implicite corespunzătoare.

Planul de acțiune va fi implementat de structurile menționate ca Responsabile și va beneficia de sprijinul unui Comitet de Coordonare așa cum este descris în Descrierea Procesului. Acesta va coordona și evalua procesul de implementare a Planului de acțiune ICBP-NS.

Comunitatea de cercetare ICBP-NS va participa la procesul de implementare a planului de acțiune prin:

1. reprezentanți ai comunității de cercetare, membri ai comitetului de coordonare, 2. Grupul de
lucru, care a participat la faza inițială, își va juca în continuare rolul de vehicul principal în desfășurarea procesului și se va transforma într-un
Comitet de Monitorizare. care va contribui la implementarea acțiunilor propuse și va evalua progresul implementării, pentru a identifica în timp real problemele care pot apărea în timpul implementării. Comitetul de Monitorizare va raporta periodic Comitetului de Coordonare cu privire la progresul fiecărei acțiuni.
3. Grupul de lucru care reprezintă comunitatea de cercetare va avea o influență semnificativă asupra procesului de implementare. Pentru a implica pe deplin comunitatea de cercetare, se propune organizarea unui eveniment de prezentare pentru tot personalul a activităților Strategiei și Planului de Acțiune HRS4R, precum și a unui document de prezentare a unui rezumat al strategiei HRS4R.

Un sondaj va fi efectuat anual pentru a evalua satisfacția comunității ICBP-NS cu strategia HRS4R. Rezultatele sondajului vor fi evaluate de Comitetul de Monitorizare. La doi ani de la implementarea Planului de acțiune, va fi efectuată o revizuire internă a strategiei HRS4R. Comitetul de monitorizare va revizui principiile C&C și politica OTM-R și va lua în considerare ajustările necesare în cazul în care obiectivele declarate nu sunt atinse. Se va verifica nivelul de implementare a planului de acțiune, detectând eventualele neconformități și indicând acțiunile corective propuse. Acest raport va fi discutat și aprobat de Comitetul de Coordonare și va fi prezentat structurilor decizionale de la nivelul ICBP-NS pentru confirmare finală.

Asigurați-vă că acoperiți și toate aspectele evidențiate în lista de verificare de mai jos, pe care va trebui să le descrieți în detaliu:

Notă: Faceți clic pe fiecare întrebare din lista de verificare pentru a deschide editorul.

Cum va supraveghea în mod regulat progresul comitetul de implementare și/sau grupul de coordonare?*

Descriere detaliată și justificare în mod corespunzător (max. 500 de cuvinte)

Comitetul de Coordonare va analiza periodic progresele înregistrate în ceea ce privește livrabilele incluse în Planul de Acțiuni, inclusiv realizarea indicatorilor.

Comitetul de Monitorizare va analiza și va fi responsabil de urmărirea respectării calendarului de realizare a indicatorilor, a problemelor întâlnite în timpul implementării, a riscurilor asociate și a măsurilor de evitare a acestora. Acesta va prezenta periodic Comitetului de Coordonare stadiul implementării acțiunilor, care va discuta cu părțile relevante rezultatele obținute în fiecare etapă pentru a crea condiții favorabile pentru implementarea cu succes a

Planul de acțiune.

Cum intenționați să implicați comunitatea de cercetare, principalele părți interesate, în procesul de implementare?*

Descriere detaliată și justificare în mod corespunzător (max. 500 de cuvinte)

Comunitatea de cercetare ICBP-NS va participa la procesul de implementare a planului de acțiune prin:

1. reprezentanți ai comunității de cercetare, membri ai comitetului de coordonare, 2. Grupul de lucru,
care a participat la faza inițială, va continua să își joace rolul de vehicul principal în
dezvoltarea procesului și se va transforma într-un Comitet de Monitorizare care va contribui la implementarea acțiunilor propuse și va evalua progresul implementării, pentru a identifica în timp real problemele care pot apărea în timpul implementării. Comitetul de Monitorizare va raporta periodic Comitetului Director cu privire la progresul fiecărei acțiuni.

3. Grupul de lucru care reprezintă comunitatea de cercetare va avea o influență semnificativă asupra procesului de implementare. Pentru a implica pe deplin comunitatea de cercetare, se propune organizarea unui eveniment de prezentare pentru tot personalul a activităților Strategiei și Planului de Acțiune HRS4R, precum și a unui document care prezintă un rezumat al strategiei HRS4R.

Cum procedați cu alinierea politicilor organizaționale cu HRS4R? Asigurați-vă că HRS4R este recunoscut în strategia de cercetare a organizației, ca politică generală de resurse umane. *

Descriere detaliată și justificare în mod corespunzător (max. 500 de cuvinte)

Acțiunile propuse vor fi vehiculul principal de sprijinire a realizării obiectivelor identificate în Strategia ICBP-NS și în Planul de Management (2023-2027).

Planul de acțiune propus reprezintă transformarea previziunilor componentei Strategiei de Resurse Umane de Cercetare a IBPC-NS în faze concrete de implementare pe o perioadă multianuală, cu o structură de supraveghere și persoane responsabile desemnate să desfășoare fiecare acțiune în cadrul planului de acțiune ca precum i pentru atingerea obiectivelor strategice implicite corespunzătoare.

HRS4R va fi pe deplin integrat și recunoscut în strategia de cercetare ICBP-NS care va face obiectul unei campanii de informare și conștientizare pe parcursul celor 2 ani de implementare a Planului de acțiune.

Cum vă veți asigura că acțiunile propuse sunt implementate?*

Descriere detaliată și justificare în mod corespunzător (max. 500 de cuvinte)

Analiza decalajelor și planul de acțiune au fost aprobate de structura de conducere decizională ICBP-NS.

Prin urmare, planul de acțiune propus are sprijin instituțional la cel mai înalt nivel pentru a fi implementat.

Comitetul de Coordonare și Comitetul de Monitorizare includ toți membrii conducerii ICBP-NS, precum și oameni cheie din structura administrativă. Responsabilii de implementarea acțiunilor sunt și persoane care se regăsesc în cele 2 comitete.

Procesul de implementare va include consultarea regulată cu părțile interesate relevante.

Membrii grupului de lucru care au participat inițial la analiza decalajelor vor fi invitați să contribuie la revizuirile periodice ale planului de acțiune.

Aceștia vor continua să joace un rol important în monitorizarea operațională informală anuală și în monitorizarea internă formală la sfârșitul fiecărui ciclu.

Cum veți monitoriza progresul (cronologia)?*

Descriere detaliată și justificare în mod corespunzător (max. 500 de cuvinte)

Consiliul de monitorizare va evalua periodic progresul în implementarea tuturor fazelor conform diagramei Gantt a Planului de acțiuni, pentru a identifica cât mai repede posibil problemele care pot apărea în timpul implementării, etapele de referință și livrabilele, precum și indicatorii vor fi urmarit.

Comitetul de Monitorizare va raporta periodic despre derularea fiecărei acțiuni Comitetului de Coordonare, care va putea lua decizii menite să minimizeze impactul neîndeplinirii sarcinilor asumate și controlul riscurilor aferente pentru eliminarea oricăror probleme care pot apărea în timpul implementării.

Va exista organizare:

- ședințe trimestriale ale Comisiei de Monitorizare implicate în implementarea planului de acțiuni ședințe semestriale
- ale Comitetului de Coordonare la care vor participa membrii Comisiei de Monitorizare și focus grupuri organizate pentru cercetători din
- comunitatea științifică ICBP-NS, în special prin consultarea acestora de două ori pe an pentru a primi informații și a evalua percepția în schimbare a cercetătorilor asupra implementării C&C.

Cum veți măsura progresul (indicatorii) în vederea următoarei evaluări?*

Descriere detaliată și justificare în mod corespunzător (max. 500 de cuvinte)

Indicatorii sunt stabiliți individual pentru toate acțiunile planificate.

Acești indicatori vor fi evaluați periodic de către Comitetul de Monitorizare, iar Comitetul de Coordonare va fi responsabil cu luarea deciziilor pentru atingerea obiectivelor stabilite prin Planul de Acțiune propus.

Observații/comentarii suplimentare despre procesul de implementare propus: (max. 1000 de cuvinte)

Pentru a respecta pe deplin Carta și Codul European pentru Cercetători, este necesar să se facă cunoscute comunității IBPC-NS, prin intermediul site-ului IBPC-NS și a intranetului, toate documentele referitoare la Codul de Etică, existente/revizuite. proceduri și să disemineze aspectele de bună practică privind principiile de etică, procesul de cercetare și managementul proiectelor de cercetare.

Principiile bunei practici de cercetare vor fi descrise în secțiuni dedicate ale site-ului web IBPC-NS cu linii directoare pentru a ghida cercetătorul în realizarea unei cereri de cercetare și implementarea unui proiect de cercetare. De asemenea, vor fi publicate exemple de bune practici în activitatea de cercetare, care vor oferi informații relevante pentru a sprijini atât implementarea activităților de cercetare, cât și diseminarea rezultatelor cercetării.

Cercetătorii vor fi sprijiniți în activitățile lor de cercetare și prin accesul la baza de date și la rezultatele cercetării disponibile la nivelul IBPC-NS.

Pentru a asigura respectarea deplină a principiilor C&C și a politicii OTM-R, este necesară elaborarea unei politici de dezvoltare a carierei la IBPC-NS, care să contureze în mod coerent cadrul instituțional, activitățile, mecanismele și resursele, respectiv structurile responsabile cu planificarea, monitorizarea și evaluarea performanței în carieră, integrarea practicilor de supraveghere și mentorat.
Pentru a stimula mobilitățile de ieșire și de intrare, se va elabora o procedură, iar mobilitățile vor fi considerate un avantaj în procesul de evaluare și selecție.

Excelența HR în cercetare

Lista de verificare OTM-R

Lista de verificare OTM-R

Numărul cazului

2022RO843264

Nume Organizație în curs de revizuire

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

Datele de contact ale organizației

Bogdan Petriceicu Hasdeu, nr. 8 , BUCURESTI, 050568, Romania

Data și codul de aprobare

06.10.2022

Data depunerii la Comisia Europeană

06.11.2024

Listă de verificare pentru recrutare deschisă, transparentă și bazată pe merit: OTM-R

O listă de verificare specifică de autoevaluare este oferită pentru recrutarea deschisă, transparentă și bazată pe merit (OTM-R). Vă rugăm să raportați cu privire la stadiul realizării, de asemenea detalii despre indicatorii și forma de măsurare utilizată.

- Casetele de selectare „Deschis", „Transparent" și „Bazat pe merit" sunt indicative pentru tipul de politici și practici la care se referă întrebările, așa cum este detaliat în C&C. Sunt prestabilite în instrumentul electronic HRS4R și nu pot fi modificate. Nu este necesară nicio acțiune din partea instituțiilor în privința lor.
- Diferența dintre evaluările „+/- Da substanțial" și „-/+ Da parțial" este că, în primul caz, volumul lucrării rămase de făcut până la finalizare este mic în comparație cu efortul depus până acum în acea direcție, în timp ce pentru „-/+ Da parțial", munca rămasă este fie aceeași ca volum, fie mai mare decât ceea ce a fost realizat.
- Pentru coloana „Indicatori sugerați", ori de câte ori utilizatorul plasează mouse-ul pe rândul dedicat fiecărei întrebări, va apărea o casetă de text mică, indicând opțiunile potențialilor indicatori de utilizat. Cu toate acestea, fiecare instituție ar trebui să identifice propriile măsurători ale eficienței politicii sale OTM-R, care ar trebui revizuite și adaptate în continuare.

	Răspuns deschis transparent bazat pe merit:				Indicatori sugerați (sau formă de măsurare)
Sistem OTM-R					
Avem noi a publicat o versiune a noastră Politica OTM-R online (în limba națională și în engleză)?	X	X	X	-- Nu	Nu încă. Politica OTM-R urmează să fie dezvoltată în primii 2 ani de Plan de Acțiune http://www.icbp.ro

	Răspuns deschis transparent bazat pe merit:				Indicatori sugerați (sau formă de măsurare)
Avem un ghid intern stabilind clar OTM-R proceduri și practici pentru toate tipurile de posturi?	X	X	X	-- Nu	Nu încă. O procedură internă care abordează problemele OTM-R va fi elaborată în primul trimestru al perioadei de implementare a măsurilor din Planul de acțiuni
Toată lumea este implicată în proces suficient de instruit în domeniul OTM-R?	X	X	X	-/+ Da parțial	Se organizează periodic instruiri în domeniul recrutării și selecției personalului. Cursurile speciale de formare vor fi incluse în cadrul anual de dezvoltare profesională continuă (CPD) Program de subliniere a prevederilor politicii OTM-R. Statisticile privind participarea la cursurile de formare OTM-R vor fi separate.
Facem noi utilizarea (suficientă) a recrutării electronice instrumente?	X	X		++ Da complet	Toate locurile de muncă vacante sunt publicate în mod deschis și transparent pe site-ul instituțional, pe platforma EURAXESS euraxess.gov.ro și pe platforma națională de cercetare jobs.research.gov.ro
Avem o sistem de control al calității pentru OTM-R în vigoare?	X	X	X	-/+ Da parțial	Un control instituțional al calității există și se desfășoară în toate domeniile de activitate. Dispoziții speciale vor fi incluse după ce politica OTM-R va fi concepută și aprobată în conformitate cu PA propus.

	Răspuns deschis transparent bazat pe merit:				Indicatori sugerați (sau formă de măsurare)
Are curentul nostru Politica OTM-R a incuraja extern candidații la aplica?	X	X	X	-/+ Da parțial	Această prioritate face parte din strategia Institutului de-a lungul timpului și va fi integrată în politica OTM-R. Politica OTM-R este în prezent în curs de dezvoltare, iar unul dintre obiectivele strategice este de a spori atractivitatea în rândul potențialilor candidați externi.
Este curentul nostru Politica OTM-R în conformitate cu politicile de atragere cercetători din in strainatate?	X	X	X	+/- Da în mod substanțial	Chiar de la înființare, IBPC a inițiat colaborări cu cercetarea internațională institu iilor. Colaborările au devenit tradițional de-a lungul anilor, iar în ultimii 10 ani, institutul a dezvoltat proiecte cu directori străini și echipe mixte. În prezent, institutul are încă 5 proiecte coordonate de directori străini, iar cercetătorii din străinătate sunt incluși și în echipele de cercetare.
Este curentul nostru Politica OTM-R în conformitate cu politicile de atragere grupuri subreprezentate?	X	X	X	+/- Da în mod substanțial	Metodologia actuală pentru recrutarea și selecția cercetătorilor include specificații despre atragerea grupurilor subreprezentate.
Este curentul nostru Politica OTM-R în conformitate cu politicile de a oferi condiții de muncă atractive pentru cercetători?	X	X	X	+/- Da în mod substanțial	Strategia actuală de dezvoltare menționează angajamentul de a asigura condiții excelente de muncă pentru angajați, indiferent de categorie.

	Răspuns deschis transparent bazat pe merit:			Indicatori sugerați (sau formă de măsurare)
Avem noi înseamnă a monitoriza fie cel mai mult potrivit cercetători aplica?			-- Nu	Aplicația include condiții specifice pentru potențialii candidați, ceea ce înseamnă că numai cercetătorii potriviți pot îndeplini conditii de recrutare.
Faza de publicitate și aplicare				
Avem clar linii directoare sau șabloane (de exemplu, EURAXESS) pentru poziții de publicitate?	X	X	++ Da complet	Toate reclamele ref. locurile de muncă vacante de cercetare sunt întocmite conform prevederilor legale românești în vigoare și publicate pe site-ul instituțional, pe euraxess.gov.ro și pe jobs.research.gov.ro
Includem în anun ul de angajare referințe/linkuri către toate elementele prevăzute în secțiunea relevantă a trusa de instrumente?	X	X	+/- Da în mod substanțial	Anunțul de angajare menționează următoarele: - poziția postului din organigrama - fișa postului și documentele necesare cererii - condițiile legale de îndeplinit pentru a fi eligibil pentru un post academic/ de cercetare - criterii de selecție și numire - calendarul recrutării și selecției proceduri Un set de instrumente pentru aplicații online va fi dezvoltat ca parte a AP
Facem plin utilizarea de EURAXESS către ne asigurăm cercetare locurile vacante ajung la a	X	X	++ Da complet	Toate reclamele ref. locurile de muncă vacante de cercetare sunt întocmite conform prevederilor legale române în vigoare și publicate pe euraxess.gov.ro și

	Răspuns deschis transparent bazat pe merit:				Indicatori sugerați (sau formă de măsurare)
Ne folosim a altor instrumente de publicitate pentru locuri de muncă?	X	X		++ Da complet	Da, folosim site-ul nostru instituțional și jobs.research.gov.ro
Ținem administrativul povara pentru a minim pentru candidat?	X			++ Da complet	Candidatul este asistat în toate etapele procesului de candidatură și selecție de către Departamentul instituției HR și de către Departamentul Șef care a scos postul la concurs sau de către directorul de proiect, dacă este cazul. Dosarul de cerere este standardizat, este furnizată o listă de verificare, număr de apel pentru orice întrebări suplimentare etc.
Faza de selecție și evaluare					
Avem clar regulile care reglementează numirea selecției comitete?		X	X	+/- Da în mod substanțial	Da, există reguli clare. Metodologia de recrutare și selecție a cercetătorilor include criteriile de eligibilitate care urmează a fi aplicate în procesul de numire a membrilor comisiei de selecție, merit științific recunoscut în domeniul postului vacant.
Avem clar regulile privind componen a selec ie comitete?		X	X	+/- Da în mod substanțial	Se stabilesc un set de criterii academice privind componența comisiilor de selecție în conformitate cu prevederile legale care funcționează în acest domeniu. Includerea experților externi din sectorul sănătății va face parte din AP pentru a crește atractivitatea pentru candidații în transport. dezvoltare.

	Răspuns deschis transparent bazat pe merit:			Indicatori sugerați (sau formă de măsurare)
Sunt cele comitete suficient de echilibrat între sexe?	X	X	++ Da complet	Da, procedura de recrutare și selecție a personalului menționează necesitatea asigurării echilibrului de gen. Deși, domeniile de cercetare ale Institutului sunt dominate de femei, după cum se arată în ultimii 50 de ani de la înființare.
Avem clar linii directoare pentru selecție comitete care ajută la judecarea „meritului” într-un mod care duce la cel mai bun candidat fiind selectat?		X	++ Da complet	Da, toți membrii comisiei de selecție ar trebui să ocupe cel puțin aceeași funcție ca și locurile de muncă vacante.
Faza de numire				
Îi informăm pe toți solicitanții la sfârșitul selec ie proces?	X		++ Da complet	Da, toți candidații primesc feedback scris la sfârșitul procesului de selecție
Oferim feedback adecvat intervievați?	X		++ Da complet	Da, după încheierea interviului, toți candidații primesc feedback oficial din partea selecției comitet.

	Răspuns deschis transparent bazat pe merit:		Indicatori sugerați (sau formă de măsurare)
Avem un mecanism adecvat de reclamații în loc?	X	++ Da complet	Da, Managementul Calității se asigură că orice membru al personalului poate face plângeri (de exemplu, etică, numire, decizii de management legate de locul de muncă, etc.) De asemenea, metodologia de recrutare și selecție a personalului academic cuprinde prevederi referitoare la procedura de reclamatie.
Evaluare generală			
Avem o sistem în vigoare pentru a evalua dacă OTM-R livrează asupra obiectivelor sale?		-- Nu	Nu încă

HR Excellence in Research

OTM-R Checklist

OTM-R Checklist

Case number

2022RO843264

Name Organisation under review

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"

Organisation’s contact details

Bogdan Petriceicu Hasdeu, nr. 8 , BUCURESTI, 050568, Romania

Date endorsement charter and code

06/10/2022

Submission date to the European Commission

11/06/2024

Open, Transparent, and Merit-based Recruitment Check-list: OTM-R

A specific self-assessment checklist is provided for Open, Transparent and Merit-Based Recruitment (OTM-R). Please report on the status of achievement, also detail on the indicators and the form of measurement used.

- The "Open", "Transparent" and "Merit-based" checkboxes are indicative of the type of policies and practices the questions refer to, as detailed in the C&C. They are pre-set in the HRS4R E-tool and cannot be changed. No action is needed from institutions in their respect.
- The difference between "+/- Yes substantially" and "-/+ Yes partially" ratings is that in the first case the volume of the remaining work to be done until completion is little as compared to the effort that has been put so far in that direction, whereas for "-/+ Yes partially", the remaining work is either the same in volume or more than what has been achieved.
- For the "Suggested indicators" column, whenever the user hovers the mouse in the row dedicated to each question, a small text box will pop up, indicating options of potential indicators to use. However, each institution should identify own measurements of the effectiveness of its OTM-R policy which should be further reviewed and adapted.

	Open	**Transparent**	**Meritbased**	**Answer:**	**Suggested indicators (or form of measurement)**
OTM-R system					
Have we published a version of our OTM-R policy online (in the national language and in English)?	x	x	x	-- No	Not yet. The OTM-R Policy is going to be developed in the first 2 years of Action Plan http://www.icbp.ro

	Open	Transparent	Meritbased	Answer:	Suggested indicators (or form of measurement)
Do we have an internal guide setting out clear OTM-R procedures and practices for all types of positions?	x	x	x	-- No	Not yet. An internal procedure addressing the OTM-R issues will be developed on the 1st quarter of the period for the implementation of measures within the Action Plan
Is everyone involved in the process sufficiently trained in the area of OTM-R?	x	x	x	-/+ Yes partially	Training in the field of staff recruitment and selection is regularly organized. Special training courses will be included in the annual Continuing Professional Development (CPD) Program to emphasize the OTM-R policy provisions. Statistics of OTM-R training courses attendance will be separately.
Do we make (sufficient) use of e-recruitment tools?	x	x		++ Yes completely	All job vacancies are openly and transparently published on the institutional website, on EURAXESS platform euraxess.gov.ro and on the national platform for research jobs.research.gov.ro
Do we have a quality control system for OTM-R in place?	x	x	x	-/+ Yes partially	An institutional quality control exists and is running in all fields of activity. Special provisions will be included after the OTM-R policy will be designed and approved in accordance with the proposed AP.

	Open	Transparent	Meritbased	Answer:	Suggested indicators (or form of measurement)
Does our current OTM-R policy encourage external candidates to apply?	x	x	x	-/+ Yes partially	This priority is part of the Institute strategy along the time and will be integrated on OTM-R policy. OTM-R policy is currently under development and one of the strategic objectives is about enhancing the attractiveness among external potential candidates.
Is our current OTM-R policy in line with policies to attract researchers from abroad?	x	x	x	+/- Yes substantially	Right from its foundation, IBPC initiated collaborations with international research institutions. The collaborations have become traditional over the years, and in the past 10 years, the institute has developed projects with foreign directors and mixed teams. Currently, the institute has 5 more projects coordinated by foreign directors, and researchers from abroad are also included in the research teams.
Is our current OTM-R policy in line with policies to attract underrepresented groups?	x	x	x	+/- Yes substantially	Current methodology for recruitment & selection of researchers includes specifications about attracting underrepresented groups.
Is our current OTM-R policy in line with policies to provide attractive working conditions for researchers?	x	x	x	+/- Yes substantially	Current development strategy mention the commitment to ensure the excellent working conditions for employees, no matter what category.

	Open	Transparent	Meritbased	Answer:	Suggested indicators (or form of measurement)
Do we have means to monitor whether the most suitable researchers apply?				-- No	The application includes specific conditions for potential candidates which means that only suitable researchers can meet the recruitment conditions.
Advertising and application phase					
Do we have clear guidelines or templates (e.g., EURAXESS) for advertising positions?	x	x		++ Yes completely	All advertisements ref. research job vacancies are drafted according to the Romanian legal provisions in place and published on the institutional website, on euraxess.gov.ro and on jobs.research.gov.ro
Do we include in the job advertisement references/links to all the elements foreseen in the relevant section of the toolkit?	x	x		+/- Yes substantially	The job advertisement mentions the following: - job position in the organizational chart - job description and application required documents - legal conditions to fulfil to be eligible for an academic/research position - selection & appointment criteria - the calendar of the recruitment & selection procedures An online application toolkit will be developed as part of AP
Do we make full use of EURAXESS to ensure our research vacancies reach a wider audience?	x	x		++ Yes completely	All advertisements ref. research job vacancies are drafted according to the Romanian legal provisions in place and published on euraxess.gov.ro and

	Open	Transparent	Meritbased	Answer:	Suggested indicators (or form of measurement)
Do we make use of other job advertising tools?	x	x		++ Yes completely	Yes, we are using our institutional website and jobs.research.gov.ro
Do we keep the administrative burden to a minimum for the candidate?	x			++ Yes completely	The candidate is assisted in all stages of the application and selection process by the HR institution Department and by the Chief Department that put the job out for competition or by the project director, if applicable. The application file is standardized, a checklist is provided, call number for any additional queries, etc.
Selection and evaluation phase					
Do we have clear rules governing the appointment of selection committees?		x	x	+/- Yes substantially	Yes, clear rules are in place. The methodology for recruitment & selection of researchers includes the eligibility criteria to be applied in the process of appointing the members of the selection committee, recognized scientific merit in the field of the vacant position.
Do we have clear rules concerning the composition of selection committees?		x	x	+/- Yes substantially	A set of academic criteria are established concerning the composition of selection committees in accordance with the legal provisions functioning in this area. Including of the external experts from health sector will be part of the PA in order raise the attractiveness for candidates in carrier development.

	Open	Transparent	Meritbased	Answer:	Suggested indicators (or form of measurement)
Are the committees sufficiently gender-balanced?		x	x	++ Yes completely	Yes, staff recruitment & selection procedure mentions the need of ensuring the gender balance. Although, the Institute fields of research are women-dominated as it shows on the last 50 years since the establishment.
Do we have clear guidelines for selection committees which help to judge ‘merit’ in a way that leads to the best candidate being selected?			x	++ Yes completely	Yes, all members of the selection committee should hold at least the same position as the job vacancies.
Appointment phase					
Do we inform all applicants at the end of the selection process?		x		++ Yes completely	Yes, all candidates receive written feedback at the end of the selection process
Do we provide adequate feedback to interviewees?		x		++ Yes completely	Yes, after the interview ends, all candidates receive official feedback from the selection committee.

	Open	Transparent	Meritbased	Answer:	Suggested indicators (or form of measurement)
Do we have an appropriate complaints mechanism in place?		x		++ Yes completely	Yes, Quality Management ensures that any staff member can complaint (eg. ethics, appointment, management decisions related to their job, etc.) Also, the methodology for recruitment & selection of academic staff includes provisions regarding the complaint procedure.
Overall assessment					
Do we have a system in place to assess whether OTM-R delivers on its objectives?				-- No	Not yet

CNATDCU – Comisia de *Biologie* şi *Biochimie*

Criterii minimale privind acordarea calificativelor la susţinerea tezelor de doctorat

Ţinând cont de reglementările din *Codul studiilor universitare de doctorat* (H.G. 681/2011, art. 68 al.1 şi 70 al.4) şi de necesitatea unor evaluări unitare la nivelul ţării noastre, se recomandă Comisiilor de susţinere publică a tezelor de doctorat din domeniul Biologie şi Biochimie să ţină cont de următoarele criterii minimale în aprecierile ce urmează să le facă, Comisia de specialitate din cadrul CNATDCU rezervându-şi dreptul de a modifica aceste calificative, în cazul în care criteriile minimale nu sunt respectate:

1. calificativul "***Excelent***" (ceea ce însemnă înscrierea pe diplomă a distincţiei "*Summa cum laude*") se va acorda dacă: *i)* doctorandul a publicat minimum două articole în reviste cotate ISI, din care cel puţin unul ca autor principal[1]; sau *ii)* dacă a publicat doar un singur articol, ca autor principal, într-o revistă cu factor de impact mai mare sau egal cu 3;
2. calificativul "***Foarte bine***" (ceea ce însemnă înscrierea pe diplomă a distincţiei "*Magna cum laude*") se va acorda dacă doctorandul a publicat, ca autor principal, minimum două articole, dintre care unul într-o revistă cotată ISI şi unul într-o revistă indexată în BDI[2];
3. calificativul "***Bine***" (ceea ce presupune înscrierea distincţiei "*Cum laude*") dacă doctorandul a publicat minimum două articole, ca autor principal, în reviste indexate BDI;
4. calificativul "***Satisfăcător***" (ceea ce înseamnă fără distincţie) dacă a publicat minimum două articole, din care unul ca autor principal într-o revistă indexată în BDI.

Precizări: **1**. prin autor principal se înţelege prim autor sau autor corespondent, în condiţiile în care nu sunt alte precizări în revista respectivă;

2. prin BDI se înţeleg acele baze de date considerate semnificative pentru domeniul Biologie şi Biochimie: *Thomson Master Lis, Biology Browser, CAB Abstracts, ProQuest CSA/Biological Sciences, Index Copernicus*, ş.a., Comisia acceptând şi sistemul de clasificare românesc, dar numai revistele care au fost incluse in B^+, după sistemul CNCSIS;

Prin revistă cotată ISI se înţelege acea revistă care deţine un IF mai mare decât 0,000 şi nicidecum una care este înscrisă numai în *Thomson Master List*.

În toate cazurile se acceptă ca unul din articole să fie "*in press*", cu condiţia ca acest lucru să fie justificat printr-un document oficial - în original, altul decât un simplu mesaj E-mail.

Conducătorii de doctorat sunt rugaţi să prezinte aceste cerinţe minimale studenţilor doctoranzi încă de la înscrierea lor şi să acţioneze pentru ca acestea să fie realizate, în caz contrar apărând riscul neconfirmării titlului de doctor, respectiv a schimbării calificativului acordat de comisia de doctorat.

Preşedinte Comisie,
Prof.dr. Vasile Cristea

MEMORIUL ȘTIINȚIFIC

Subsemnata **Neculachi Carmen Alexandra**, student doctorand în cadrul SCOSAAR, Școala Doctorală de Științele Vieții, înmatriculat la data de **2.11.2020** în domeniul de studii universitare de doctorat Biologie, la conducătorul de doctorat **C.S. I Dr. Alexandrina Burlacu,** autor al tezei de doctorat cu titlul ***Studiul rolului hypoxamiR-210 în răspunsul inflamator pe modele de șoareci transgenici pentru identificarea unor ținte comune în hipoxie și inflamație***, declar următoarele activități realizate in cadrul stagiului doctoral:

A. Lista de lucrări științifice

1. Neculachi CA, Nastase-Rusu EG, Cherry L, Marinescu-Colan CI, Tastsoglou S, Cosman BP, Popa AM, Panciuc C, Zaccagnini G, Catrina SB, Simionescu M, Martelli F, Preda MB, Burlacu A. miR-210 promotes the anti-inflammatory phenotype and M2 polarization in murine macrophages. Frontiers in Immunology, 2025; 16: 1633163. doi: 10.3389/fimmu.2025.1633163. Factorul de impact al revistei în anul precedent publicării (2024): 5.9 (Q1).
2. Neculachi CA*, Leti LI*, Burlacu A, Preda MB. Inflammation and hypoxia negatively impact the survival and immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells in vitro. Romanian Journal of Cardiology, 2021; 31(3): 547–554. doi: 10.47803/rjc.2021.31.3.547. (*contribuții egale). Revistă indexată BDI.
3. Cherry L, Popescu S, Neculachi CA, Nastase-Rusu EG, Marinescu-Colan CI, Cosman BP, Ciortan L, Martelli F, Simionescu M, Butoi E, Burlacu A, Preda MB. Mesenchymal stromal cells modulate neutrophil phenotype via paracrine signals. Stem Cell Research & Therapy, 2025; 16(1): 574. doi: 10.1186/s13287-025-04684-w. Factorul de impact al revistei în anul precedent publicării (2024): 7.3 (Q1).
4. Preda MB, Nastase-Rusu EG, Neculachi CA, Zhong X, Voellenkle C, Mazure NM, Balacescu O, Ivan C, Zheng XW, Gherghiceanu M, Lebrigand K, Simionescu M, Martelli F, Mari B, Catrina SB, Burlacu A, Ivan M. miR-210 locus deletion disrupts cellular homeostasis: an integrated genetic study. Scientific Reports, 2025; 15(1): 22659. doi: 10.1038/s41598-025-07572-8. Factorul de impact al revistei în anul precedent publicării (2024): 3.9 (Q1).
5. Marinescu-Colan CI, Nastase-Rusu EG, Neculachi CA, Martelli F, Cherry L, Preda MB, Burlacu A. From cancer to heart fibrosis – GLIPR1 highlights a subset of myofibroblasts responsive to mesenchymal stem cell therapy after myocardial infarction. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2025; 187: 118087. doi: 10.1016/j.biopha.2025.118087. Factorul de impact al revistei în anul precedent publicării (2024): 7.5 (Q1).

6. Rusu-Nastase EG, Lupan AM, Marinescu CI, Neculachi CA, Preda MB, Burlacu A. MiR-29a increase in aging may function as a compensatory mechanism against cardiac fibrosis through SERPINH1 downregulation. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 2022; 8: 810241. doi: 10.3389/fcvm.2021.810241. Factorul de impact al revistei în anul publicării (2022): 3.6 (Q2).
7. Preda MB, Neculachi CA, Fenyo IM, Vacaru AM, Publik MA, Simionescu M, Burlacu A. Short lifespan of syngeneic transplanted MSC is a consequence of in vivo apoptosis and immune cell recruitment in mice. Cell Death & Disease, 2021; 12(6): 566. doi: 10.1038/s41419-021-03839-w. Factorul de impact al revistei în anul publicării (2022): 8.5 (Q1).
8. Marinescu CI, Preda MB, Neculachi CA, Rusu EG, Popescu S, Burlacu A. Identification of a hematopoietic cell population emerging from mouse bone marrow with proliferative potential in vitro and immunomodulatory capacity. Frontiers in Immunology, 2021; 12: 698070. doi: 10.3389/fimmu.2021.698070. Factorul de impact al revistei în anul publicării (2021): 7.6 (Q1).
9. Preda MB, Lupan AM, Neculachi CA, Leti LI, Fenyo IM, Popescu S, Rusu EG, Marinescu CI, Simionescu M, Burlacu A. Evidence of mesenchymal stromal cell adaptation to local microenvironment following subcutaneous transplantation. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020; 24(18): 10889–10897. doi: 10.1111/jcmm.15717. Factorul de impact al revistei în anul publicării (2020): 5.3 (Q2).

B. Participări la conferințe/workshop-uri

1. Neculachi CA, Nastase-Rusu EG, Zaccagnini G, Martelli F, Burlacu A, Preda MB. The role of hypoxamir-210 on macrophage behaviour. Poster presentation, International Conference and XXXIX Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology, Cluj-Napoca, Romania, Octombrie 21–23, 2022.
2. Neculachi CA, Nastase-Rusu EG, Marinescu-Colan CI, Preda MB, Burlacu A. MiR-210 deficiency enhances pro-inflammatory activation and disrupts M2 macrophage differentiation in murine models. Prezentare poster în cadrul 42nd Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology, București, Romania, 20–21 Noiembrie, 2025.
3. Neculachi CA, Nastase-Rusu EG, Cherry L, Marinescu-Colan CI, Tastsoglou S, Cosman BP, Simionescu M, Martelli F, Preda MB, Burlacu A. MiR-210 is required for complete polarisation of M2 macrophages. Prezentare poster în cadrul CBFH Biennial Meeting – ESC Working Groups on Cellular Biology of the Heart and Myocardial Function, Naples, Italy, 26–28 Noiembrie 2025.
4. Neculachi CA, prezentare orală în cadrul 9th COST Action CardioRNA MC and WG Meeting, "miR-210 at the overlap between hypoxia signalling and inflammatory pathways in macrophage biology", Universitatea din Nicosia, Nicosia, Cipru, 22-24 Februarie 2023

C. Proiecte

1. Colaborator – Proiect PNRR-III-C9-2022-I8-186: „Targeting Cardiac Fibrosis in Heart Failure: Challenges and Potential Solutions Based on ncRNA Therapeutics" (FibroThera). Director de proiect: Dr. Fabio Martelli (Director științific, Laboratorul de Cardiologie Moleculară, I.R.C.C.S. Policlinico San Donato, Italia). Perioada: 2023–2026.
2. Colaborator – Proiect PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0172: „Targeting Innate Immune Mechanisms to Improve Risk Stratification and to Identify Future Therapeutic Options in Myocardial Infarction" (INNATE-MI). Director de proiect: Acad. Maya Simionescu. Perioada: 2020–2022.
3. Colaborator – Proiect PN-III-P1-1.1-TE-2019-1893: „MiR-210 Genomic Locus at the Overlap Between Hypoxia Signalling and Inflammatory Networks" (210-HINT). Director de proiect: Dr. Bogdan Preda. Perioada: 2021 –2022.

D. Stagii de cercetare/perfecționare

1. Neculachi CA. Bursă mobilitate de cercetare Short-Term Scientific Mission (STSM) acordată în cadrul COST Action CA17129 – CardioRNA: Functional Significance of the Non-Coding Genome in the Cardiovascular System. Titlul proiectului: miR-210 at the overlap between hypoxia signalling and inflammatory pathways in macrophage biology. Instituție gazdă: IRCCS Policlinico San Donato, Milano, Italia (coord. Prof. Fabio Martelli). Perioada: 15 iunie 2022 – 31 august 2022 (3 luni).

E. Cursuri de perfecționare

1. Al 12-lea Curs Internațional privind Animalele de Laborator (FELASA) – CULA 2026, Creta, Heraklion, aprilie-mai 2026.
2. 5-Day Intensive, Hands-On Course – *„Exploring Genomes and Gene Regulation Linked to Cardiovascular Phenotypes"*. Institutul de Biologie Celulară și Patologie „Nicolae Simionescu", Academia Română, București, octombrie 2025. Coordonator: Dr. Mihai Bogdan Preda (ICBP-NS); co-organizatori: Prof. Mircea Ivan, MD, PhD (Indiana University School of Medicine) și Acad. Maya Simionescu (Director ICBP-NS).
3. Cursul „Flow Cytometry Training School". Asociația Română de Citometrie, București, 14–15 decembrie 2020.

Student-doctorand

.....

PROIECT PN II - IDEI

PN2 1159 / 19.01.2009, Dr. Adriana Georgescu

Titlul proiectului:

Complicatiile vasculare ale arteriolelor la pacientii cu obezitate asociata sau nu diabetului de tip 2; disfunctiile endoteliale si rezistenta la insulina

Director proiect: Dr. Adriana Georgescu, cercetator stiintific principal II **-** *Institutul de Biologie si Patologie Celulara „Nicolae Simionescu", Bucuresti*
si
Postdoctorand -
Institutul de Chimie Macromoleculara „Petru Poni", Iasi

Proiect finantat de: - Programul National pentru Cercetare–Dezvoltare si Inovare 2 (PNCD I-2), Ministerul Educatiei, Cercetarii si Tineretului, Autoritatea Nationala Pentru Cercetare Stiintifica,
Programul 1 -
Idei -
Proiecte de cercetare exploratorie

Perioada: 2008-2011

Rezumatul proiectului:

OBEZITATEA, REZISTENTA LA INSULINA SI DISFUNCTIILE ENDOTELIALE COEXISTA IN DIABETUL DE TIP 2.

IN ACEST PROIECT, VOM STUDIA DACA OBEZITATEA ASOCIATA SAU NU DIABETULUI DE TIP 2 INDUCE MODIFICARI LA NIVELUL ARTERIOLELOR. IN ACEST SCOP, ARTERIOLELE IZOLATE DIN TESUTUL ADIPOS SUBCUTAN PRELEVAT DE LA PACIENTI OBEZI CU SI FARA DIABET DE TIP 2 SI SUBIECTI NORMALI VOR FI INVESTIGATE PENTRU: (1) REMODELAREA PERETELUI VASCULAR, (2) FUNCTIA ARTERIOLELOR, (3) EFECTELE INSULINEI ASUPRA TONUSULUI VASOMOTOR, (4) CALEA DE SEMNALIZARE A INSULINEI, TINTIND MOLECULELE IMPLICATE IN EFECTELE EI ANTIATEROGENE, (5) RELATIA CAUZALA DIRECTA INTRE DISFUNCTIILE ENDOTELIALE SI RASPUNSUL INFLAMATOR AL PERETELUI ARETERIAL.

COMPARATIV CU SUBIECTII CONTROL, LA PACIENTII OBEZI CU SI FARA DIABET DE TIP 2, REZULTATELE VOR ARATA CONCENTRATII CRESCUTE DE GLUCOZA SI MODIFICARI SEMNIFICATIVE ALE ARTERIOLELOR, INCLUZAND: 1) MODIFICARI ULTRASTRUCTURALE SI MOLECULARE, INDICAND REMODELAREA VASCULARA A PERETELUI VASELOR, (2) RASPUNSURI CONTRACTILE CRESCUTE LA NA, 5-HT, KCL, (3) VASODILATATIE DETERIORATA SEMNIFICATIV LA ACH, SNP SI LA INSULINA, (4) EXPRIMARE GENICA SI PROTEICA DIMINUATA A IRS-1,2, PI3-KINAZEI, AKT, P-AKT, ENOS, P-ENOS , ERK, P-ERK, MOLECULE IMPLICATE IN CALEA DE SEMNALIZARE A INSULINEI, (5) ELIBERARE REDUSA DE NO, (6) EXPRIMARE GENICA SI PROTEICA ALTERATA A MARKERILOR INFLAMATORI SPECIFICI DIN PERETELE VASCULAR. EXTINCTIA ALTERARILOR STRUCTURALE-FUNCTIONALE DIN VASELE DE REZISTENTA MICI VA FI MULT MAI PRONUNTATA LA PACIENTII OBEZI CU DIABET DE TIP 2 COMPARATIV CU PACIENTII OBEZI, SUGERAND CA CEI DOI FACTORI DE RISC POT AVEA EFECTE SINERGICE ASUPRA VASCULATURII.

IN CONCLUZIE, REZULTATELE STUDIULUI VOR DEMONSTRA CA IN OBEZITATE, DISFUNCTIILE ENDOTELIALE GENEREAZA UN EFECT VASODILATATOR REDUS LA INSULINA SI MODIFICARI ALE MOLECULELOR IMPLICATE IN CALEA EI DE SEMNALIZARE. ACESTE MODIFICARI AR PUTEA CONDUCE LA REZISTENTA LA INSULINA SI ULTERIOR LA DIABETUL DE TIP 2.

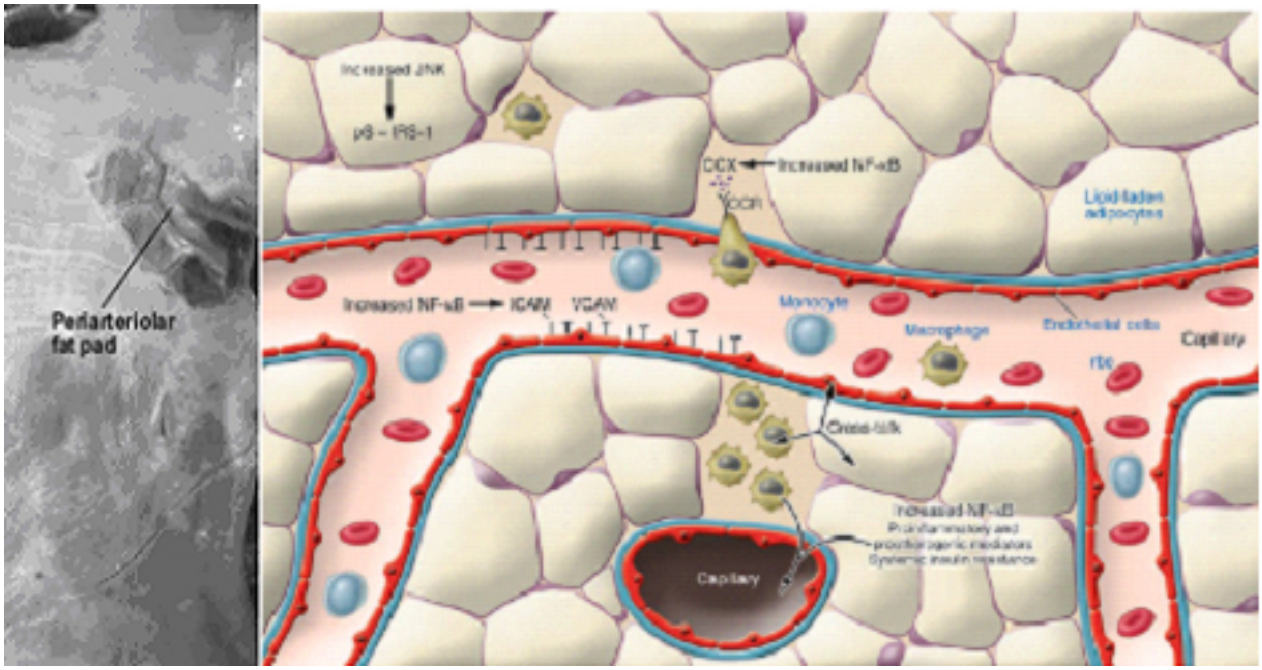
Echipa de cercetare:

Cercetatori cu experienta:

Dr. Adriana Georgescu

Acad. Maya Simionescu
Dr. Doina Popov

Cercetatori în formare:
Dr. Nicoleta Alexandru (doctorat sustinut în iunie 2009)
Drd. Miruna Nemecz



Arteriolele izolate de la tesutul adipos subcutan.

Obiectiv General: Pornind de la premiza ca studiile asupra arteriolelor de rezistenta din tesutul adipos sunt slab concludente, obiectivul proiectului prezent este de a intelege corelatiile structura-functie si mecanismele celulare prin care obezitatea sau obezitatea asociata diabetului de tip 2 induc efecte locale in patul microvascular, cu consecinte asupra relatiei adipocit-perete vascular.

Modul de organizare a proiectului (managementul proiectului): Planul de lucru

Etapa intermediara an 2009

Obiectiv 1: Caracterizarea pacientilor cu obezitate asociata sau nu diebetului de tip 2, comparativ cu subiectii control (C);

Etapa finala an 2009

Obiectiv 2: Caracteristicile structurale ale arteriolelor izolate din tesutul adipos subcutan prelevat de la pacienti obezi cu si fara diabet de tip 2 si de la subiecti normali; rolul metaloproteazelor matriceale (MMPs) si a inhibitorilor tisulari ai metaloproteazelor (TIMP);

Etapa unica an 2010

Obiectiv 3: Evaluarea functiei peretelui arterial in relatie cu modificarile structurale si biochimice la pacientii cu obezitate asociata sau nu diabetului de tip 2, comparativ cu subiectii control;

Obiectiv 4: Efectul insulinei asupra tonusului vasomotor arterial la pacientii cu obezitate asociata sau nu diabetului de tip 2, comparativ cu subiectii sanatosi de tip control; mecanismul celular implicat;

Etapa unica an 2011

Objectiv 5: Studiul caii de semnalizare a insulinei tintind moleculele implicate in efectul antiaterogen;

Obiectiv 6: Studiul relatiei cauzale directe dintre disfunctia endoteliala a arteriolelor si raspunsul inflamator al peretelui vascular arterial, prin investigarea exprimarii proteice a markerilor inflamatori specifici (P-selectina, E-selectina, V-selectina, vWF, TF, IL-6, MCP-1, RANTES, eNOs, VEGF,SDF-1);

Rezultate obtinute

Rezultate semnificative pentru anul 2009:

Comparativ cu subiectii normali, pentru pacientii obezi cu si fara diabet de tip 2 rezultatele au aratat ca: (1) indicele de masa corporala a fost > 35 kg/m^2, circumferinta interna a fost >100
cm pentru barbati si >87,5 cm pentru femei; pacientii obezi cu diabet de tip 2 au avut concentratiile plasmatice de glucoza >105mg/dl; (2) modificarile structurale (activarea endoteliului vascular, acumularea de colagen in interiorul peretelui vascular) sugereaza remodelarea vasculara a peretelui arterial; (3) expresia proteica a markerilor inflamatori specifici (
MMP-2, MMP-9, MMP-12, TIMP-1, TIMP-, colagen de tip 1)
cu rol in migrarea celulelor musculare netede (SMC), hiperplazia intimei, remodelarea vasculara,
s-a modificat semnificativ. De asemenea, comparativ cu pacientii obezi, la pacientii obezi cu diabet de tip 2, modificarile structurale si ale expresiilor proteice au fost alterate semnificativ

In concluzie, rezultatele obtinute pana acum demonstreaza ca obezitatea modifica arteriolele din tesutul adipos periombilical uman, atat structural cat si biochimic, iar aceste alterari sunt ulterior agravate, atunci cand obezitatea este asociata cu diabetul de tip 2.

Rezultate semnificative pentru anul 2010:

Obezitatea associata sau nu diabetului de tip 2 induce:

(1) disfunctii endoteliale vasculare ale arteriolelor izolate din tesutul adipos subcutan uman;

(2) starea de rezistenta la insulina;

Comparativ cu subiectii normali, pentru pacientii obezi cu sau fara diabet de tip 2 rezultatele au aratat ca:

(1) raspunsul contractil al arteriolelor la noradrenalina (NA, 10-8 – 10-4M),5-hidroxitriptamina (5-HT, 10-8-10-4M) si potasiu (K+, 24.4 mM, 42.46 mM, 64.1 mM, 83.93 mM, 123.7 mM) a fost crescut;

(2) vasodilatatia dependenta de endoteliu la acetilcolina (ACh, 10-8 – 10-4M) si independenta de endoteliu la nitroprusiat de sodiu (SNP , 10-8 – 10-4M) au fost drastic reduse;

(3) relaxarea la insulina (0,4 – 6,4 IU/ml) a fost redusa semnificativ printr-un mechanism dependent de PI3-Kinaza si oxidul nitric (NO);

· comparativ cu pacientii obezi, la pacientii obezi cu diabet de tip 2, functia peretelui vascular a fost alterata semnificativ.

® Prezenta disfunctiilor vasculare la pacientii obezi ar putea induce starea de rezistenta la insulina si aparitia diabetului de tip 2.

® Alterarile functionale ale arteriolelor se coreleaza pozitiv cu modificarile biochimice, structurale, a exprimarii moleculelor proinflamatorii obtinute in prima etapa a proiectului, realizata in anul 2009.

® Aceste noi descoperiri in mecanismele disfunctiei endoteliale si ale relaxarii la insulina, ar putea conduce la noi strategii terapeutice.

Publicatii rezultate
An 2009

Articole în jurnale de specialitate cotate ISI:

1. A.Georgescu, N.Alexandru, D.Popov, M. Amuzescu, E.Andrei, C.Zamfir, H.Maniu, A.Badila.Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles.Journal of Thrombosis and Haemostasis,7 (9):2009,1566-75- f.imp 6.3

2. D. Popov, M Nemecz, M. Dumitrescu, A. Georgescu, F.D. Böhmer. Long-term high glucose concentration influences Akt, ERK1/2, and PTP1B protein expression in human aortic smooth muscle cells.
Biochem. Biophys ResearchCommunications, 388(1):51-55. f.imp 2,64.

Lucrari prezentate la manifestari stiintifice internationale

1. A. Georgescu, N. Alexandru, D. Popov, M. Amuzescu, E. Andrei, M. Nemecz, C. Zamfir, A. Badila, M. Simionescu. Elevation of endothelial and platelet microparticles in patients with chronic venou s insufficiency, at XXII Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis , July 11-16 2009, Boston , USA.

2. L-D. Popov, M. Nemecz, M. Dumitrescu, A. Georgescu, F. D. Böhmer. Long time culture of human aortic smooth muscle cells in high glucose concentration up-regulates ERK1/2 activation and PTP1B protein expression, at 45th EASD Annual Meeting, Vienna, Austria, 29.09.2009-02.10.2009, published in Diabetologia , 52, Suppl. 1, p.S515, nr. 1336, 2009.

Premii obtinute la manifestari stiintifice

1. Premiu oferit de Comitetul de premiere pentru "the ISTH 2009 Developing World Scientist Grants" pentru prezentarea: Elevation of endothelial and platelet microparticles in patients with chronic venous insufficiency .
A. Georgescu, N. Alexandru, D. Popov, M. Amuzescu, E. Andrei, M. Nemecz, C. Zamfir, A. Badila, M. Simionescu, at XXII Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis , July 11-16 2009, Boston , USA.

An 2010

Articole în jurnale de specialitate cotate ISI

1. Sadri Chahed, Aurélie S. Leroyer, Mounir Benzerroug, David Gaucher, Adriana Georgescu, Serge Picaud, Jean-Sébastien Silvestre, Alain Gaudric, Alain Tedgui, Pascale Massin, Chantal M. Boulange. Increased vitreous shedding of microparticles in proliferative diabetic retinopathy stimulates endothelial proliferation. Diabetes, 59, 694-701, 2010.-
factor de impact 8.4

2. Adriana Georgescu, Doina Popov, Anamaria Constantin, Miruna Nemecz, Nicoleta Alexandru, Daniel Cochior, Aura Tudor. Dysfunction of human subcutaneous FAT arterioles in obesity associated or not with Type 2 diabetes.
Clinical Science,
in press 2010
– factor de impact 4.2

3. Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Emanuel Dragan, Eugen Andrei, Adriana Georgescu. Platelets activation in hypertension associated with hypercholesterolemia; effects of irbersartan. Journal of Thrombosis and Haemostasis, in press 2010. – factor de impact 6.4

Articole în jurnale indexate în baze de date internationale (BDI)

1. Miruna Nemecz, Doina Popov, Adriana Georgescu.
Phosphorylation/dephosphorylation signaling events in the aorta of streptozotocin-injected Golden Syrian Hamsters. Annals of RSCB, vol XV, issue 1, 28-34, 2010. (CNCSIS B+)

2. Doina Popov. Endothelial cell dysfunction in hyperglycemia: Phenotypic change, intracellular signaling modification, ultrastructural alteration and potential clinical outcomes. International Journal of Diabetes Mellitus doi:10.1016/j.ijdm.2010.09.002 2010.

Carti publicate la edituri internationale

1. Adriana Georgescu, Felicia Antohe. Editor a unei monografii internationale 'From Vascular Cell Biology to Cardiovascular Medicine' publicata de RESEARCH SIGNPOST TRANSWORLD RESEARCH NETWORK, Trivandrum - 695023, Kerala, India, ISBN - 978-81-7895-503-2, in press 2010.

Carti publicate la edituri nationale

1. N. Alexandru. Disfunctia plachetara in imbatranire si patologia cardiovasculara, Editura Agir, Bucuresti,159 pagini, ISBN 978-973-720-289-5, 2010.

Capitole de carte

1. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov. Ongoing data on vascular endothelial cell dysfunction: an update. 'From Vascular Cell Biology to Cardiovascular Medicine', Ed: Adriana Georgescu, Felicia Antohe, published by RESEARCH SIGNPOST TRANSWORLD RESEARCH NETWORK, ISBN - 978-81-7895-503-2, in press 2010.

Rezumate aparute in jurnale ISI

1. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Eugen Andrei, Irina Titorencu, Emanuel Dragan, Cristina Tarziu, Silviu Ghiorghe, Elisabeta Badila, Daniela Bartos, Maya Simionescu. Ratio of microparticles to endothelial progenitor cells, a marker of vascular dysfunction induced by combined hypertension and hypercholesterolemia; irbersartan effect, 'the 78th European Atherosclerosis Society Congress', Hamburg, Germany, in Atherosclerosis Supplements, Volume 11, Issue 2, Page 12, June 20 - 23, 2010.- factor de impact 6.55

2. Nicoleta Alexandru, Adriana Georgescu, Doina Popov, Eugen Andrei, Emanuel Dragan, Maya Simionescu. Irbesartan reduces platelets activation in hypertensive-hypercholesterolemic hamster, 'the 78th European Atherosclerosis Society

Congress', Hamburg, Germany, in Atherosclerosis Supplements, Volume 11, Issue 2, Page 181-182, June 20 - 23, 2010. factor de impact 6.55

Prezentari orale

1. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Emanuel Dragan, Eugen Andrei, Irina Titorencu, Maya Simionescu. Raportul dintre microparticulele circulante si celulele endoteliale progenitoare -un nou marker celular al disfunctiilor vasculare., pag 26, Sesi unea Stiintifica Anuala a Societatii Romane de Biologie Celulara , Constanta iunie, 2010.

2. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Eugen Andrei, Irina Titorencu, Emanuel Dragan, Cristina Tarziu, Silviu Ghiorghe, Elisabeta Badila, Daniela Bartos, Maya Simionescu. Ratio of microparticles to endothelial progenitor cells, a marker of vascular dysfunction induced by combined hypertension and hypercholesterolemia; irbersartan effect, ' the 78th European Atherosclerosis Society Congress', Hamburg, Germany, in Atherosclerosis Supplements , Volume 11, Issue 2, Page 12, June 20 - 23, 2010.

3. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Eugen Andrei, Emanuel Dragan, Irina Titorencu, Maya Simionescu. Role of circulating microparticles and of endothelial progenitor cells in atherosclerosis; the pharmacological effects of irbersartan. Yearly Scientific Session. Workshop: Cellular and molecular biology for the human health. Bucharest, September 8, 2010.

Postere prezentate la Conferinte Internationale

1. Nicoleta Alexandru, Adriana Georgescu, Doina Popov, Eugen Andrei, Emanuel Dragan, Maya Simionescu. Irbesartan reduces platelets activation in hypertensive-hypercholesterolemic hamster, 'the 78th European Atherosclerosis Society Congress', Hamburg, Germany, in Atherosclerosis Supplements, Volume 11, Issue 2, Page 181-182, June 20 - 23, 2010.

2. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Eugen Andrei, Irina Titorencu, Emanuel Dragan, Maya Simionescu. Microparticles and endothelial progenitor cells as markers of vascular dysfunction induced by combined hypertension and hypercholesterolemia. Diaspora in scientific research and in high education. Exploratory Workshop: Tendencies and emergences in Stem Cell Biology and Embryology Research, Bucharest, September 22, 23,
2010.

Postere prezentate la Conferinte nationale

1. Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Eugen Andrei, Emanuel Dragan, Adriana Georgescu. Irbersartanul atenueaza modificarile plachetare induse de hipertensiunea asociata hipercolesterolemiei. A XXVIII-A Sesiune Stiintifica Anuala a Societatii Romane de Biologie Celulara, Constanta ,9- 12 iunie 2010, Buletinul SRBC, pag . 113.

Premii

1. Adriana Georgescu - Premiu oferit de Ministerul Educatiei si Cercetarii pentru articol publicat in 2009:Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Manuela Amuzescu, Eugen Andrei, Constantin Zamfir, Horia Maniu, Adrian Badila .Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles. Journal of Thrombosis and Haemostasis,
7 (9): 1566-1575, 2009.

2. Adriana Georgescu - Premiul "Constantin Velican" pentru contributii remarcabile in domeniul patologiei celulare si moleculare a bolilor cardiovasculare, oferit la
A XXVIII-A Sesiune Stiintifica Anuala a Societatii Romane de Biologie Celulara, Constanta, Romania,
9- 12 iunie
2010.

3. Adriana Georgescu - Premiu oferit de Ministerul Educatiei si Cercetarii pentru articol

publicat in 2010: Sadri Chahed, Aurélie S. Leroyer, Mounir Benzerroug, David Gaucher, Adriana Georgescu, Serge Picaud, Jean-Sébastien Silvestre, Alain Gaudric, Alain Tedgui, Pascale Massin, Chantal M. Boulange. Increased vitreous shedding of microparticles in proliferative diabetic retinopathy stimulates endothelial proliferation. Diabetes, 59, 694-701, 2010.

REGULAMENT PRIVIND ORGANIZAREA ŞI DESFĂȘURAREA CONCURSULUI DE ADMITERE LA STUDIILE UNIVERSITARE DE DOCTORAT

Metodologia organizării şi desfăşurării concursului de admitere la studiile universitare de doctorat

I. Norme de organizare

Concursul de admitere, din anul 2024 pentru toate domeniile de doctorat din cadrul fiecărei Școli doctorale din cadrul Școlii de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR) se va desfășura conform legislației în vigoare:

- ***Legea învăţământului superior nr. 199/2023 din 4 iulie 2023;***
- ***Regulamentul - cadru privind studiile universitare de doctorat nr. 3.020/08.01.2024;***
- ***Ordinul Nr. 3693/2024 din 1 februarie 2024 pentru aprobarea Metodologiei-cadru privind organizarea admiterii în învăţământul superior în ciclurile de studii universitare de scurtă durată, de licenţă, de master şi de doctorat***

Concursul de admitere la doctorat se organizează de către Academia Română prin Școala de Studii Avansate a Academiei Române, abilitată să organizeze doctorate.

Concursul pentru admiterea la studiile universitare de doctorat se poate organiza, de regulă, în sesiunea din septembrie sau în două sesiuni, pentru școlile doctorale care consideră necesar acest demers, cu respectarea legislației în vigoare, în condiţii identice, înainte de începerea anului universitar, dar nu mai târziu de 30 septembrie.

Aceste informații vor fi aduse la cunoştinţă celor interesaţi prin afişare sau postarea pe pagina web. Studiile universitare de doctorat se organizează la forma cu frecvență.

II. Calendarul admiterii

Înscrierile şi concursul de admitere la studiile universitare de doctorat se desfășoară conform calendarului de desfășurare a concursului de admitere la doctorat, anexă la prezentul regulament.

Înscrierile la colocviul de admitere se vor face de regulă, în luna septembrie la institutele afiliate Școlilor doctorale. Colocviul de admitere la doctorat se va desfăşura în luna septembrie.

În cazul în care va exista și o altă sesiune de admitere, calendarul admiterii va fi stabilit de fiecare școală doctorală în parte, cu respectarea legislației în vigoare.

III. Pregătirea desfăşurării concursului de admitere

În vederea organizării concursului de admitere la doctorat, Școlile doctorale transmit către SCOSAAR situația cu numărul de locuri solicitate de către fiecare conducator de doctorat.

Consiliului Științific SCOSAAR (CSUD) analizează solicitările conducătorilor de doctorat privind numărul de locuri vacante finanțate. În această privință, se va ține cont de cerințele unei încărcări echilibrate pentru fiecare conducător de doctorat în vederea asigurării calității studiilor universitare de doctorat. Numărul maxim de locuri cu bursă acordate unui conducător de doctorat este de 8. De

asemenea, evaluarea presupune cunoașterea activității conducătorului de doctorat, ținând cont și de titlurile de doctor obținute de către studenții de doctorat coordonați.

Consiliul Științific SCOSAAR (CSUD) înaintează spre aprobare Prezidiului Academiei Române lista locurilor finanțate cu bursă sau finanțate fără bursă per conducător de doctorat/institut.

Conducătorii de doctorat transmit institutelor de cercetare ale Academiei Române tematicile și bibliografia aferentă colocviului de admitere în vederea afișării pe pagina web a institutelor.

Școlile doctorale primesc de la institutele afiliate tematicile și bibliografia aferentă colocviului de admitere și le transmit către SCOSAAR în vederea afișării pe pagina web a SCOSAAR

Școlile doctorale elaborează şi adoptă regulamente proprii de admitere, care apoi vor fi supuse aprobării CSD, Directorului şcolii respective și CSUD. Aceste regulamente vor trebui să cuprindă:

- Forma de desfăşurare a concursului de admitere, inclusiv structura probelor din cadrul acestuia şi organizarea a una sau mai multe comisii sau subcomisii de admitere;
- Tematica concursului de admitere şi bibliografia comună, dacă este cazul;
- Criteriile de evaluare şi criterii de departajare a candidaţilor;
- Pentru institutele de cercetare care organizează admiterea cu ajutorul mai multor comisii sau subcomisii, se va prevedea explicit modul în care se va realiza clasificarea tuturor candidaţilor dintr-un domeniu de doctorat pe o listă unică, în ordinea descrescătoare a mediilor generale obţinute de candidaţi, în vederea alocării locurilor cu bursă/stipendium.
- Modul de soluţionare a contestaţiilor la probele scrise, dacă este cazul;

După aprobare, aceste regulamente se afişează pe pagina web a institutelor de cercetare unde se desfășoară concursul de admitere la doctorat.

Regulamentele proprii de admitere pot prevedea posibilitatea susţinerii online a concursului de admitere.

Școlile doctorale vor desemna comisiile de admitere şi, după caz, comisiile de soluţionare a contestaţiilor.

IV. Condiţii generale de înscriere la concurs

Înscrierea la concursul de admitere se face personal de către candidat sau de către altă persoană cu procură notarială pe baza actului de identitate.

Cu ocazia înscrierii la concursul de admitere, candidatul la studiile universitare de doctorat își alege un conducător de doctorat dintre acei conducători de doctorat ai Şcolii doctorale unde doreşte să studieze și care are locuri vacante pentru concursul de admitere.

Înscrierea la concursul de admitere la studii universitare de doctorat în cadrul institutului unde se organizează admiterea la de studiile universitare de doctorat, nu este condiţionată de domeniul în care a fost dobândită diploma de licenţă sau masterat.

La colocviul de admitere la doctorat se pot prezenta absolvenţi ai studiilor universitare de masterat, dar şi absolvenţii cu diplomă de licenţă sau echivalentă (diploma de licenţă a absolvenţilor unor programe de studii de 5 sau 6 ani, forma de învăţământ "zi" - învăţământ de lungă durată), eliberată, de regulă, până în anul absolvirii primei promoţii de licenţă organizate în conformitate cu prevederile Legii nr. 288/2004 privind organizarea studiilor universitare, cu modificările şi completările ulterioare.

La admiterea la studii universitare de doctorat se pot înscrie şi cetăţeni care nu fac parte din Uniunea Europeană, Spaţiul Economic European şi Confederaţia Elveţiană (extracomunitari). Recunoaşterea studiilor efectuate de către aceştia în afara României se va realiza de către direcţia de specialitate din cadrul Ministerului Educaţiei.

Admiterea românilor de pretutindeni, precum şi a cetăţenilor din state terţe Uniunii Europene se realizează în baza metodologiilor special elaborate de către Ministerul Educaţiei.

Durata totală cumulată a ciclului de studii universitare de licenţă şi masterat trebuie să fie de cel puţin 300 de credite transferabile (ECTS).

La înscriere se vor depune copii conform cu originalul după documentele solicitate; certificarea conformității cu originalul se face de către persoana/persoanele care are/au atribuţii desemnate în acest sens.

Prin excepţie, pe perioada instituirii stării de alertă, necesitate sau de urgenţă, în baza autonomiei universitare, se poate realiza înscrierea online prin încărcarea documentelor de către candidaţi cu asumarea responsabilităţii de către aceştia cu privire la autenticitatea şi corespondenţa dintre documentele digitale/scanate şi cele originale.

Înscrierile se vor face la institutele de cercetare afiliate Școlilor doctorale care organizează concurs de admitere la doctorat.

Pentru înscriere la colocviul de admitere la doctorat, candidaţii vor prezenta următoarele documente:

- cerere de înscriere – formular tip (Anexa 1);
- certificat de naştere;
- certificat de căsătorie sau alt act de schimbare a numelui;
- diplomă de bacalaureat;
- diplomă de licenţă şi foaie matricolă;
- diploma de master şi foaie matricolă;
- cartea de identitate/pașaport;
- atestat de susţinere a unui examen de competenţă lingvistică (nivelul minim B2, conform cadrului de referinţă al Consiliului Europei);
- alte certificate care atestă pregătire universitară şi /sau postuniversitară în domeniu;
- curriculum vitae - model european (Partea a I - a:CV, Partea a II - a descrierea activităţii ştiinţifice);
- lista lucrărilor ştiinţifice publicate în domeniul de studiu ales;
- lista bibliografică cu literatura de specialitate studiată pentru colocviul de admitere;
- fişa de înscriere - formular tip (Anexa 2);
- propunere privind teza de doctorat ce urmează a fi elaborată şi o scurtă prezentare a acesteia -1, 2 pagini - formular tip (Anexa 3);
- adeverinţă de salariat în cazul in care candidatul este angajat;
- în cazul studiilor doctorale cu predare în limba română, pentru cetăţenii străini – certificatul de competenţă lingvistică privind cunoaşterea limbii române/sau să depună certificate/diplome care să dovedească parcurgerea a cel puțin 4 ani consecutivi de studii în România

Absolvenţii de studii universitare de masterat, promoţia anului în curs, pot depune la dosar adeverinţa de absolvire a studiilor universitare de masterat.

Candidaţii care au efectuat studiile în străinătate au obligaţia de a prezenta la înscriere traducerea diplomei obţinute şi a atestatului de recunoaştere a acestor studii eliberat de către direcţia de specialitate din cadrul Ministerului Educaţiei

Dosarele incomplete nu sunt acceptate la înscriere.

După încheierea perioadei de înscriere la concursul de admitere, opţiunea privind conducătorul de doctorat, tema de doctorat, precum şi alte informaţii, nu pot fi modificate.

O persoană poate beneficia de finanţare de la buget pentru un singur program de doctorat.

Orice alte detalii în legătură cu admiterea la studiile universitare de doctorat pot fi obţinute de la institutele din cadrul Academiei Române, în funcție de domeniul vizat, la care candidaţii doresc să susţină concursul.

SCOSAAR prin Şcolile doctorale de la nivelul institutelor de cercetare va lua măsuri pentru aducerea la cunoştinţa candidaţilor, prin afişare în termen legal, a tematicilor şi bibliografiilor pentru programele la care se organizează concurs de admitere.

V. Desfăşurarea concursului

Accesul candidaţilor în sala de concurs se face pe baza actului de identitate şi se consemnează în lista nominală prezenţa acestora. Este interzisă intrarea în sala de concurs cu telefoane mobile, calculatoare, agende electronice sau alte materiale.

Concursul de admitere la studiile universitare de doctorat se desfăşoară în cadrul institutelor de cercetare ale Academiei Române, în prezenţa comisiei de examinare. Conducătorul de doctorat poate face parte din comisia de admitere.

Admiterea propriu-zisă la studiile universitare de doctorat este procesul de selecţie a candidaţilor pentru fiecare poziţie vacantă de student-doctorand, aprobată de Prezidiul Academiei Române pentru respectivul conducător de doctorat.

Concursul are loc în limita locurilor libere ale fiecărui conducător de doctorat.

Concursul de admitere la doctorat este valabil numai pentru domeniul de doctorat pentru care s-a înscris candidatul. Concursul se organizează pe fiecare domeniu şi conducător de doctorat, pentru locurile finanţate cu bursă sau finanțate fără bursă, statutul candidaţilor admişi stabilindu-se în funcţie de opţiunea exprimată la data înscrierii şi de media la admitere.

Selecţia candidaţilor la doctorat pentru o poziţie vacantă este realizată de comisia de admitere, în limita locurilor vacante aprobate.

În urma probei de concurs, candidaţii sunt apreciaţi în raport cu nivelul de pregătire şi informare în domeniu, cu capacitatea de a evidenţia orientările majore ale cercetării în direcţia de cercetare propusă şi cu capacitatea de a formula soluţii şi căi de rezolvare (teoretică şi experimentală) a problemelor identificate.

Evaluarea candidaţilor la concurs se va realiza în raport cu următoarele criterii (Anexa 4):

1 - Nota obținută la proba orală, evaluată în raport cu:

- Definirea obiectivelor cercetării ştiinţifice (10% din evaluare);
- Metodologia cercetării (10% din evaluare);
- Rezultatele ştiinţifice ale candidatului în domeniul ales (articole, studii menţionate în CV) (20% din evaluare);
- Gandire logică: candidatul evocă date, fenomene, evenimente, răspunde organizat la subiecte complexe, dă răspunsuri logice, coerente, la subiect (10% din evaluare);
- Exprimarea clară și precisă a ideilor: răspunde exact la întrebările ce i-au fost adresate, accentuează ideile principale, formulează fraze complexe, dar comprehensibile, nu se pierde în cuvinte, termină ideea începută, ideile prezentate au o continuitate, decurgând logic (10% din evaluare);
- Nivelul de pregătire şi informare în domeniul de doctorat ales (bibliografie, tematică) (40% din evaluare).

2- Nota obținută la prezentarea proiectului tematic de cercetare va fi evaluată în raport cu:

- Contextul ştiinţific şi motivaţia temei alese (40% din evaluare);
- Rezultatele estimate (40% din evaluare);

- Calitatea prezentării proiectului (20% din evaluare).

VI. Rezultatele concursului

Media minimă de admitere la studiile universitare de doctorat cu bursă este de 8 (opt). La fiecare probă de concurs, candidații trebuie să obțină cel puțin media 7 (șapte). Media se calculează cu două zecimale, fără rotunjire.

La medii de admitere cu punctaje egale, departajarea se va realiza în funcţie de media aritmetică dintre media de absolvire a studiilor universitare de licenţă şi media de absolvire a studiilor universitare de masterat. Prin excepţie, în cazul candidaţilor care au dreptul legal de a se înscrie la concursul de admitere la studiile universitare de doctorat fără a fi urmat studii universitare de masterat, pentru departajare se va lua în considerare media de absolvire a studiilor universitare de licenţă.

Calificativul admis/respins se stabilește în urma unui vot direct și secret al membrilor comisiei de evaluare. Rezultatele votului se regăsesc în procesul verbal atașat fiecărui dosar de candidatură evaluat/persoană.

Şcoala doctorală gestionează eventualele contestaţii înregistrate, în conformitate cu prevederile regulamentului propriu, şi afişează rezultatele derulării acestei proceduri.

(1) Eventualele contestaţii cu privire la rezultatele concursului de admitere se depun la institutul unde are loc concursul de admitere, în conformitate cu regulamentele de admitere specific școlii doctorale.

(2) Nu se admit contestaţii pentru probele orale.

(3) Nu se admit contestaţii care au la bază necunoaşterea regulamentului propriu de admitere.

(4) După expirarea termenului de rezolvare şi de răspuns (prin afişare) la contestaţii, rezultatul concursului de admitere este definitiv şi nu mai poate fi modificat.

(5) Rezolvarea contestaţiilor este în exclusivitate de competenţa comisiei de contestaţii din cadrul institutului/școlii doctorale unde a avut loc concursul de admitere. Decizia comisiei de contestaţii este definitivă.

Rezultatele finale vor fi transmise către SCOSAAR pe adresa de email scosaar@acad.ro .

Candidaţii care îşi retrag actele de înscriere înainte de afişarea rezultatului final al concursului sunt consideraţi eliminaţi din concurs.

Rezultatele concursului de admitere vor fi validate de către Consiliul şcolii doctorale (CSD) şi Consiliul pentru studii universitare de doctorat (CSUD) și aprobate de către Prezidiul Academiei Române și se aduc la cunoştinţă prin afişare în termen de cel mult 48 de ore de la data finalizării acestuia.

Candidaţii declaraţi admişi sunt înmatriculaţi la studiile universitare de doctorat în baza rezultatului concursului prin decizia preşedintelui Academiei Române.

Dosarele candidaţilor respinşi sau ale celor care renunţă la şcolarizare se restituie candidaților, la cerere, în cel mult 48 de ore de la depunerea cererii, obligatoriu gratuit, pe baza actelor de identitate, după afişarea rezultatelor finale.

VII. Înmatricularea candidaţilor declaraţi admişi

După aprobarea rezultatelor admiterii de către Prezidiul Academiei Române se va realiza înmatricularea candidaţilor declaraţi admişi.

Înmatricularea candidaţilor declaraţi admişi în urma concursului de admitere se face prin decizia preşedintelui Academiei Române. După înmatriculare, studenţii doctoranzi sunt înscrişi în Registrul

matricol unic (RMU) cu un număr unic valabil pentru întreaga perioadă de şcolarizare la specializarea/ programul de studii la care au fost admişi.

Candidaţii declaraţi admişi semnează contractul de şcolarizare. Aceştia vor întocmi, împreună cu conducătorul de doctorat, planul studiilor universitare de doctorat, semnate olograf.

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ŞCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE

ŞCOALA DOCTORALĂ DE.....

Aprobat,

Director Şcoală doctorală.....

CERERE DE INSCRIERE

pentru colocviul de admitere la doctorat

- Sesiunea:
- Domeniul de doctorat:
- Forma pregătirii: cu frecvență „cu bursă /fără bursă”*
- Conducător științific:_____

CANDIDAT:

Numele și prenumele cu inițiala tatălui…….....

Prenumele părinților: tatăl……....., mama…….....

Domiciliu stabil:

Localitatea…….....Strada.…….....

.....Nr.....Scara.....Bloc.....Apartament.....Sector…...….....Cod poștal..... E-mail.....Tel...……...

Domiciliu…….....Fax.....Tel. mobil.....

Naționalitatea……...Data nașterii…….....

Localitatea……..Județul……...

Profesia de bază……..... Locul de muncă……..

Adresa instituției unde lucrează…….....

Telefon…… E-mail.....

Studii superioare absolvite (inclusiv anul absolvirii și durata studiilor):

1……

..……

2……

.....

3.....

.....

Domeniul în care candidatul a obținut licența:

1.....

2.....

3.....

Cursuri de master absolvite (inclusiv anul absolvirii și durata studiilor):

1.....

2.....

Domeniul în care candidatul a obținut specializarea (master):

1.....

2.....

Limbi străine cunoscute (scris, citit, vorbit)…….....

…….

Menționez că am susținut testul la limba de circulație internațională .....…….. .....și am obținut, conform cadrului de referință elaborat de Consiliul Europei, nivelul.....

Starea civilă …….....

Etnie.....

Stare socială specială .....

Situație medicală specială.....

Vă rog să aprobați înscrierea pentru participarea la colocviul de admitere la doctorat sesiunea ....., forma cu frecvență și „cu bursă/fără bursă”.

Data……

Semnătura…….

*se va alege o singură variantă (cu bursă sau fără bursă)

Anexa 2

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE

SCOALA DOCTORALĂ DE .....

FIȘA DE ÎNSCRIERE

1. *Institutul* _____
2. *Domeniul*_____
3. *Forma de pregătire cu frecvență,* „cu bursă/fără bursă ”* _____

	Secțiunea 1.1 **Date personale ale candidatului[1] cu cetățenie română/străină**				
1	Numele de familie la naștere (din certificatul de naștere)				
2	Numele de familie actual (după căsătorie, înfiere etc.)				
3	Prenumele				
4	Inițialele tatălui/mamei[2]				
5	CNP[3]				
6	Data nașterii	Anul	Luna		Ziua
7	Locul nașterii	Țara de origine		Județul/ Țara[4]	Localitatea
8	Sexul	F ☐ M ☐			
9	Starea civilă[5]	Căsătorit(ă) ☐	Necăsătorit(ă) ☐	Divorțat(ă) ☐ Văduv(ă) ☐	
10	Starea socială[6]	Orfan de un părinte ☐ sau de ambii părinți ☐			
		Provenit din case de copii	Provenit din familie		

	specială	☐	monoparentală ☐	
11	Cetățenia	Română, cu domiciliul în România/ în străinătate		
		Alte cetățenii		
		Cetățenie anterioară, dacă este cazul		
12	Etnia[7]			
13	Domiciliul stabil	Țara:	Județul[8]/ (Țara[9]):	
		Localitatea:		
		Adresă (stradă, număr, bloc, scară, etaj, apartament, sector)[10]		
14	Actul de identitate / Documentul de călătorie[11]	Seria:	Numărul:	
		Eliberat de:	Data eliberării:	
		Perioada de valabilitate		
15	Alte date personale ale candidatului	Telefon,	Adresă de e-mail	
16	Candidat care se încadrează în categoria persoanelor cu dizabilități	Se bifează numai de persoanele aflate în această situație, pe bază de documente		
	Secțiunea I.3.a - Date privind pregătirea anterioară a candidatului[12] (absolvent de liceu)			
1	Studiile preuniversitare absolvite, nivel liceu	Instituția unde a absolvit		
		Țara:	Localitatea:	
		Județul:	Filiera Profilul Specializarea	
		Durata studiilor:	Anul absolvirii:	
		Forma de învățământ (Zi / Seral / FR / ID)		
2	Datele de identificare ale diplomei	Tipul (diploma de bacalaureat sau echivalentă)		
		Seria		
		Numărul		
		Emisă de		
		Anul emiterii		
		Numărul foii matricole care însoțește actul de studii		

3	Alte observații (pentru cazurile în care candidatul a absolvit studii anterioare în străinătate)	Vizarea / Recunoașterea diplomei prezentate (DGRIE - acorduri bilaterale / DGISERSD-MECTS)	
		Nr. / Serie act de recunoaștere / echivalare (eliberat de DGRIE / DERD)[13]	

	Secțiunea I.3.b.1 - Date privind pregătirea anterioară a candidatului[14] (absolvent de ciclu de învățământ universitar)			
1	Studiile universitare absolvite	Țara:	Localitatea:	
		Județul:		
		Denumirea instituției:		
		Facultatea:		
		Domeniul/ Profilul:		
		Programul de studii/ Specializarea:		
		Titlul obținut:	Forma de învățământ (zi/FR/ID/seral)	
		Forma de finantare a studiilor (buget/ taxă): Nr. de semestre finanțate de la buget:		
		Durata studiilor (ani):	Anul absolvirii:	
2	Datele de identificare ale actului de studii	Tipul – denumirea (diplomă/diplomă de licență/echivalentă)		
		Seria		
		Numărul		
		Emis de:		
		Anul emiterii:		
		Numărul suplimentului la diplomă/foii matricole care însoțește actul de studii		
3	Alte observații (pentru cazurile în care candidatul a absolvit studii în străinătate)	Vizarea/Recunoașterea diplomei prezentate (DGRIE - acorduri bilaterale/ DGISERSD-MECTS)		
		Nr./Serie act de recunoaștere/echivalare (eliberat de DGRIE / DERD)[15]		
	Secțiunea I.3.b.2 - Date privind pregătirea anterioară a candidatului[14] (absolvent de ciclu de învățământ universitar)			
1	Studiile universitare absolvite	Țara:	Localitatea:	
		Județul:		
		Denumirea instituției:		
		Facultatea:		

		Domeniul/ Profilul:	
		Programul de studii/ Specializarea:	
		Titlul obținut:	Forma de învățământ (zi/FR/ID/seral)
		Forma de finantare a studiilor (buget/ taxă): Nr. de semestre finanțate de la buget:	
		Durata studiilor (ani):	Anul absolvirii:
2	Datele de identificare ale actului de studii	Tipul – denumirea (diplomă/diplomă de master/echivalentă)	
		Seria	
		Numărul	
		Emis de:	
		Anul emiterii:	
		Numărul suplimentului la diplomă/foii matricole care însoțește actul de studii	
3	Alte observații (pentru cazurile în care candidatul a absolvit studii în străinătate)	Vizarea/Recunoașterea diplomei prezentate (DGRIE - acorduri bilaterale/ DGISERSD-MECTS)	
		Nr./Serie act de recunoaștere/echivalare (eliberat de DGRIE / DERD)[15]	

[1] La înscriere sau la modificarea datelor personale (după caz)

[2] Acolo unde este cazul (de exemplu: familie monoparentală)

[3] Sau alt cod de identificare personală, pentru candidații străini

[4] Numai pentru candidații străini

[5] Poate să nu fie declarată

[6] Se aplică doar candidaților cu o situație socială specială

[7] Numai pentru candidații români (poate să nu fie declarată)

[8] Numai pentru candidații români

[9] Numai pentru candidații străini

[10] Se solicită și pentru studenții străini

[11] Documentul de călătorie numai pentru candidații străini (act de identitate pentru cetățenii UE/ SEE sau pașaport pentru stduenții străini cu altă cetățenie decât UE/ SSE)

[12] Pentru candidatul străin care vrea să studieze în România se va considera numai documentul care atestă recunoașterea/ echivalarea studiilor anterioare (document eliberat de DERD), care permit înscrierea în învățământul superior

[13]Aplicabil pentru candidații români care au finalizat studiile anterioare în străinătate sau pentru candidații străini

[14] Se aplică și pentru candidații străini

[15] Idem 13

Prin transmiterea voluntară de către dumneavoastră a oricăror date personale sau informații, vă exprimați consimțământul pentru ca aceste date să fie colectate, înregistrate, stocate, prelucrate în bazele de date ale Academiei Române, precum și transferate către instituțiile față de care Academia Română are obligații legale.

Academia Română respectă toate obligațiile legale care îi revin în legătură cu prelucrarea de date personale.

Data: **Semnătura candidatului,**

*se va alege o singură variantă (cu bursă sau fără bursă)

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE …….

PROPUNERE TEMĂ TEZĂ DE DOCTORAT

Numele și prenumele candidatului:
.....

Domeniul în care candidează: .....

Conducătorul științific:
.....

Tema propusă:.....
.....
.....

Importanța temei (Scurtă prezentare):

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ŞCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
ŞCOALA DOCTORALĂ DE .....

Institutul..... Notă INTERVIU: .....
Nr. inreg

Sesiunea: .....
Nume, Inițiala tatălui, Prenumele: .....
CNP: .....
Semnătura candidatului: .....

Fișa evaluare INTERVIU

Profilul interviului	Puncte maxime	Puncte obținute
Partea I: Proba orală	***100p***	
• Definirea obiectelor cercetării științifice	10p	
• Metodologia cercetării	10p	
• Rezultatele științifice ale candidatului în domeniul ales	20p	
• Gândire logică	10p	
• Exprimare clară și precisă a ideilor	10p	
• Nivelul de pregătire și informare în domeniul de doctorat ales	40p	
Partea II: Prezentare proiectului tematic de cercetare	***100p***	
• Contextul științific și motivația temei alese	40p	
• Rezultatele estimate	40p	
• Calitatea prezentării proiectului	20p	
Total		

PREȘEDINTE,

MEMBRII COMISIEI,
1._____
2._____
3._____

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE .....

PROCES VERBAL

Încheiat astăzi ....., în urma desfășurării concursului de admitere la doctorat la forma *cu frecvență* „cu bursă/fără bursă” *, în domeniul de doctorat „.....”, conducător științific .....
În baza aprobării Prezidiului Academiei Române din data de ....., referitoare la organizarea și desfășurarea admiterii la doctorat în anul universitar ....., comisia a examinat dosarele candidaților care și-au prezentat activitatea și temele pe care doresc să le dezvolte în cadrul tezelor de doctorat și a evaluat rezultatele probelor concursului:

Președinte:.....

Membri:.....

.....

.....

Numele și prenumele candidatului	Cod de atribuire	Nota obținută la examenul de ……. *	Nota obținută la proba orală	Nota obținută la prezentarea proiectului tematic de cercetare	Media obținută la colocviul de admitere la doctorat**

Ca urmare a aprecierii activității candidaților și a evaluării probelor de concurs, comisia a declarat:

ADMIȘI DOCTORANZI
BURSIERI:_____
_____

ADMIȘI DOCTORANZI FĂRĂ BURSĂ: _____
_____

RESPINȘI:_____

PREȘEDINTE, **MEMBRII COMISIEI,**

1._____
2._____
3._____

_____

**pentru absolvenții cu diplomă de licență în alt domeniu decât cel ……..sau pentru cei care au absolvit în domeniul ……., dar notele obținute la disciplinele din domeniul de doctorat, rezultate din foia matricolă, sunt sub 8,00 (opt).*
***pentru declararea candidaților admiși/respinși comisia va ține cont numai de media obținută la colocviul de admitere la doctorat, cu condiția ca media la examenul de ……. să fie de cel puțin 8,00 (opt), iar calificativul la examenul de competență lingvistică la care nivelul minim să fie B2, conform cadrului de referință al Consiliului Europei (sunt condiții eliminatorii).*
Media minimă de admitere la doctorat este 8,00 (opt). Media se calculează cu două zecimale fără rotunjire.

Anexa 6

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ŞCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
ŞCOALA DOCTORALĂ DE .....

Institutul.....
Nr. inreg.

REZULTATELE COLOCVIULUI DE ADMITERE

– Sesiunea septembrie 2024 –

ID Candidat	Nume și prenume candidat	Conducător de doctorat	Nota finală la probele susținute	Admis*	
				Cu bursă	Fără bursă

Întocmit,
Nume și prenume,

Semnătura,

*** Exemplu:**

Admis	
Cu bursă	Fără bursă
DA	-
-	DA

IBPC

NICOLAE SIMIONESCU

București 19-20 septembrie 2019

Academia Română
Institutul de Biologie și Patologie Celulară
"Nicolae Simionescu"
vă invită la

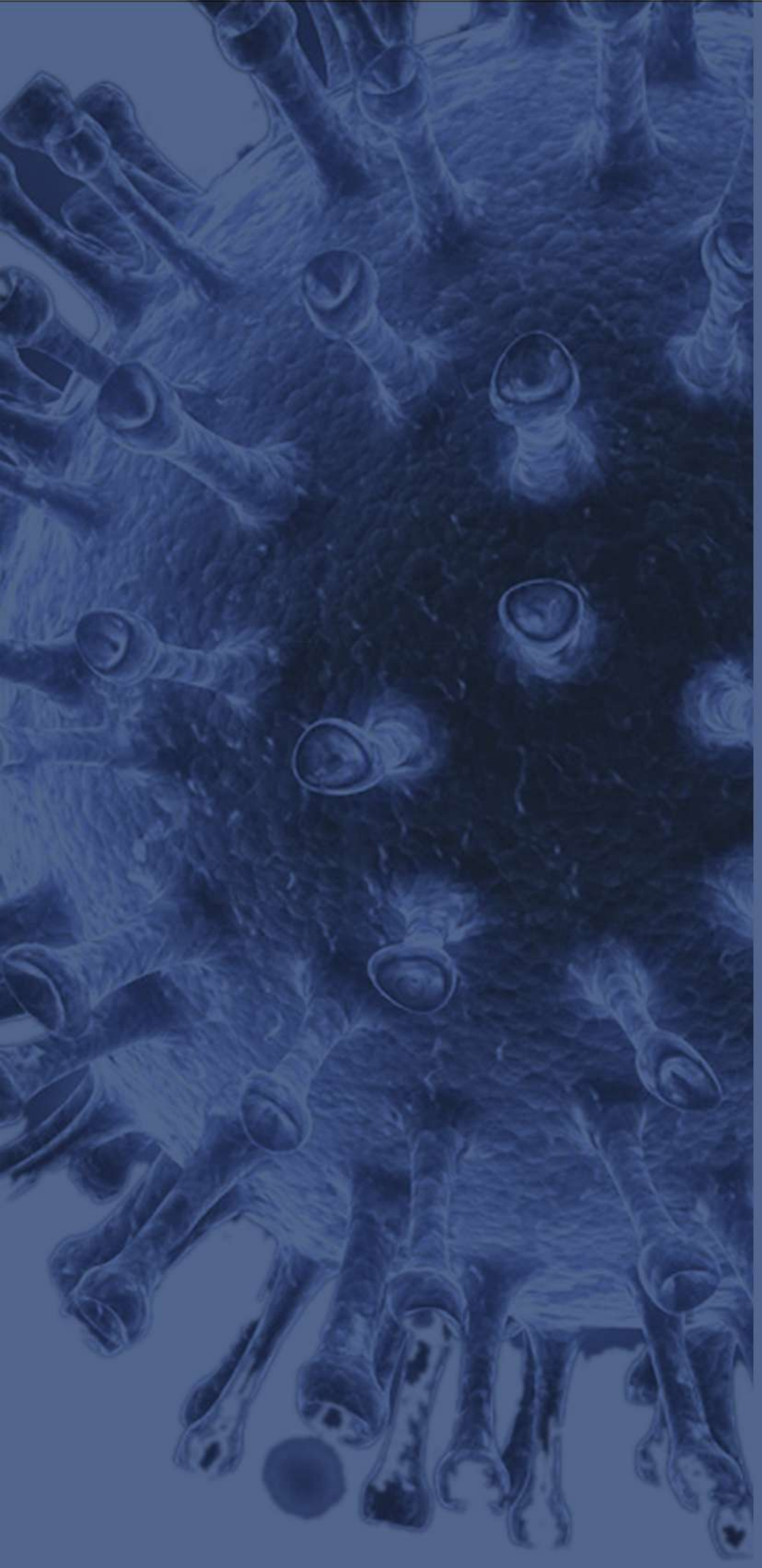
"O călătorie fascinantă de 40 de ani pentru descoperirea secretelor celulei în beneficiul sănătății omului"

"An incredible 40-year journey to understand cell's secrets for the benefit of human health"

SIMPOZIONUL ANIVERSAR:

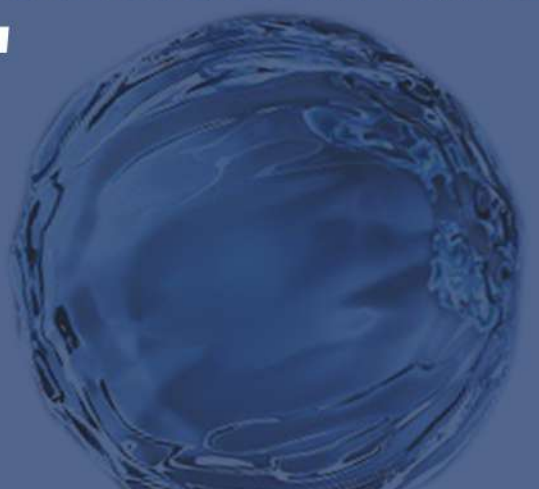
Deschiderea: 19 septembrie 2019 ora 09.30, Aula Academiei Române

FUNDAȚIA FAMILIEI "MENACHEM H. ELIAS"
ComputerLand ROMÂNIA Business to business. Person to person.
BIOMEDICA
Dialab Solutions
FUNDAȚIA PATRIMONIU A ACADEMIEI ROMÂNE
ANTISEL
REDOX
novaintermed
MERCK



ȘCOALA DE VARĂ

"Nanoparticule inteligente pentru livrarea direcționată de compuși bioactivi: preparare, caracterizare și aplicații"



Organizata in cadrul proiectului **PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697 (INTERA)**: "Terapii inteligente pentru boli non-comunicabile, bazate pe eliberarea controlată de compuși farmacologici din celule încapsulate după manipulare genetică sau bionanoparticule vectorizate",
sub-proiect INTERA 3: "Nanobioparticule inteligente concepute pentru vectorizarea compușilor bioactivi în terapia inflamației vasculare"

"Petru Poni" Institute of Macromolecular Chemistry

Program:

23 Mai 2019
Universitatea Politehnica București (UPB),
Facultatea de Chimie Aplicată și Știința Materialelor,
Cladire CAMPUS, Bd. Iuliu Maniu nr. 6.
9:00-12:00 Prezentari teoretice
13:00-17:00 Demonstrații practice in laboratoare UPB

24 Mai 2019
Institutul de Biologie si Patologie Celulara "N.Simionescu", (IBPC-NS)
Str. B.P. Hasdeu nr. 8, Sector 5, Bucuresti
9:00-12:00 Prezentari teoretice - amfiteatrul G.E. Palade
13:00-17:00 Demonstrații practice in laboratoare IBPC-NS.

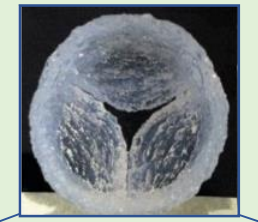
Comitet stiintific de organizare:
Dr. Manuela Calin, IBPC "NS", Bucuresti; Dr. Anca Gafencu, IBPC "NS", Bucuresti;
Prof. Anton Ficai, UPB, Bucuresti; Dr. Gheorghe Fundueanu, ICMPP, Iasi

"Petru Poni" Institute of Macromolecular Chemistry

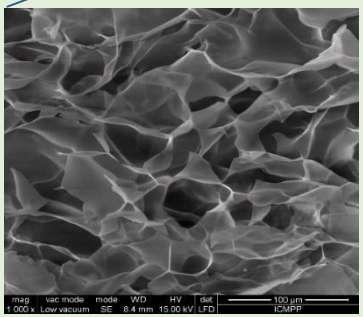
WORKSHOP : "Progrese recente in domeniul obtinerii de bio-matrici in ingineria valvei aortice"

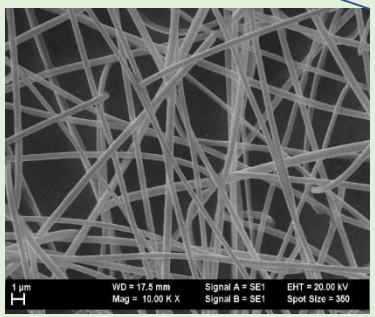
Organizat in cadrul:

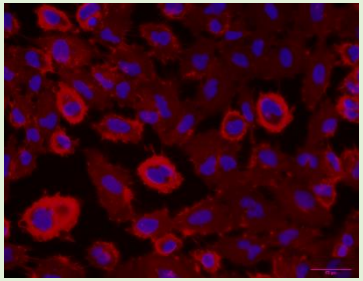
Proiectului PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697 (INTERA):
„Terapii inteligente pentru boli non-comunicabile bazate pe eliberarea controlata de compusi farmacologici din celule incapsulate dupa manipulare genetica sau bionanoparticule vectorizate"

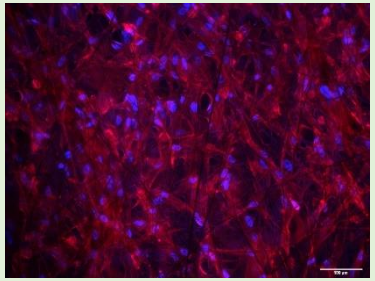


Sub-proiect: INTERA 2: Crearea unei platforme 3D concepute pentru testare pre-clinica de medicamente compusa din celule incorporate in bio-matrici tridimensionale









Program:

- **HIDROGELURI FOLOSITE IN INGINERIA TISULARA A VALVELOR AORTICE,** Diana Ciolacu, ICM "Petru Poni"
- **FABRICAREA ȘI CARACTERIZAREA UNOR PLATFORME SENZORIALE POLIMERICE PENTRU CULTURI CELULARE,** Victor Diculescu, INCDFM.
- **PROGRESE IN POPULAREA MEMBRANELOR ELECTROFILATE CU CELULE VALVULARE,** Elena Butoi, IBPC "N Simionescu"
- **DISCUTII – CONCLUZII - PERSPECTIVE**

Workshop-ul va avea loc miercuri 22 mai, 2019
între orele 13:00 -17:30, la sediul

Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu"
București, str. B. P. Hasdeu 8.

INSTITUTUL SIMIONESCU

30 ani

... IMPOSIBILUL NU EXISTĂ...

memento

NICOLAE SIMIONESCU

1979-2009

Acest volum de amintiri este publicat cu ocazia celei de-a 30-a aniversări a Institutului de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

editare
ILEANA MÂNDUȚEANU
LOREDAN ȘTEFAN NICULESCU
MAYA SIMIONESCU

viziune grafică şi coperta
OVIDIU CROITORU

arhiva foto
MARILENA DAJU

Tipărit în România la
EDITURA SEMNE

FUNDAȚIA NAȚIONALĂ PENTRU ȘTIINȚE ȘI ARTĂ
ISBN 978-973-1744-75-9

IBPC „NICOLAE SIMIONESCU”
BUCUREȘTI, 2009

2009 ® Maya Simionescu
Toate drepturile rezervate. Nicio parte a acestei publicaţii nu poate reprodusă, arhivată sau transmisă, sub orice formă, electronică, mecanică, fotocopiată, înregistrată sau în alt mod, fără permisiunea scrisă a autorului.

memento
NICOLAE
SIMIONESCU

CUPRINS

11 **LA ÎNCEPUT A FOST IDEEA...VISUL**

15 **OMAGIU PROFESORULUI NICOLAE SIMIONESCU**

15 **GEORGE E. PALADE:** NICOLAE SIMIONESCU - O VIZIUNE EXIGENTĂ, DAR LUMINOASĂ PENTRU VIITORUL ȘTIINȚELOR BIOMEDICALE ÎN ROMÂNIA

24 **GUIDO MAJNO**: ROMÂNIA A PIERDUT PE UNUL DINTRE CEI MAI DISTINȘI FII AI SĂI, DAR S-A ÎMBOGĂȚIT CU O PREȚIOASĂ MOȘTENIRE

27 **MAYA SIMIONESCU:** NICOLAE SIMIONESCU: PRIN PROPRIILE CUVINTE... PRIN CUVINTELE CONTEMPORANILOR ...

45 **NICOLAE CAJAL**: NICOLAE SIMIONESCU EXISTĂ ȘI VA EXISTA ÎNTOTDEAUNA PRIN GÂNDIREA LUI

48 **CONSTANTIN POPA**: ÎNTÂLNIREA MEA CU PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU

55 **CONSTANTIN NEACȘU**: PREGĂTIRI DE LANSARE

58 **DOINA VELICAN**: UN OM, O IDEE – SUSȚINEREA ADEVĂRATELOR VALORI

61 **ANCA SIMA**: PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU – CREATORUL ȘCOLII ROMÂNEȘTI DE BIOLOGIE CELULARĂ ȘI MOLECULARĂ

65 **CONSTANTINA HELTIANU**: 1980 - RECEPTORUL LA HISTAMINĂ, PRIMA VICTORIE, PRIMA CUPĂ DE ȘAMPANIE ÎN IBPC

67 **DOINA POPOV**: DE LA SITUSURI DE LEGARE A ALBUMINEI LA RECEPTORUL PENTRU ALBUMINĂ

70 **FELICIA ANTOHE**: TRANSCITOZA MACROMOLECULELOR PRIN ENDOTELIUL VASCULAR - UN CONCEPT PRELUAT DE COMUNITATEA ȘTIINȚIFICĂ INTERNAȚIONALĂ

73 **VICTOR V. JINGA**: PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU - SCHIȚĂ BIOGRAFICĂ

78 **ALBUM NICOLAE SIMIONESCU**

99 PRELEGERI ALE PROFESORULUI NICOLAE SIMIONESCU
99 MIHAI EMINESCU – UN SECOL DE NEMURIRE
102 THE CELL, A WISDOM IN IDENTITY AND INTEGRATION

111 PROF. NICOLAE SIMIONESCU ÎN INTERVIU CU DOMNUL NICOLAE TZONE

130 POLITICA ȘTIINȚEI ÎN VIZIUNEA ACADEMICIANULUI NICOLAE SIMIONESCU

137 QUO VADIS, ACADEMIA?
PROMOVAREA UNEI POLITICI MODERNE ÎN ABORDAREA CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE ROMÂNEȘTI

151 PRINCIPII GENERALE ALE STRATEGIEI REFORMEI CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE ȘI DEZVOLTĂRII TEHNOLOGICE ÎN ROMÂNIA

162 QUO VADIS, ACADEMIA?
FINANȚAREA COMPETITIVĂ A CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE PRIN GRANTURILE ACADEMIEI ROMÂNE

171 ACTIVITĂȚILE PROFESORULUI NICOLAE SIMIONESCU ÎN ANUL ÎN CARE A FOST VICEPREȘEDINTE AL ACADEMIEI ROMÂNE

175 REVISTE INTERNAȚIONALE:
DESPRE PROF. NICOLAE SIMIONESCU

180 ETAPE ÎN REALIZAREA VISULUI
180 CONCEPȚIA
186 CONSTRUCȚIA

191 AMINTIRI

250 GÂNDURI SCRISE SAU SPUSE
250 DESPRE CELULĂ
250 DESPRE CERCETĂTORI
251 DESPRE CERCETARE
253 DESPRE MENTORI ȘI TINERI
254 DESPRE ȘTIINȚĂ
256 DESPRE ACADEMIE

257 IMPOSIBILUL NU EXISTĂ

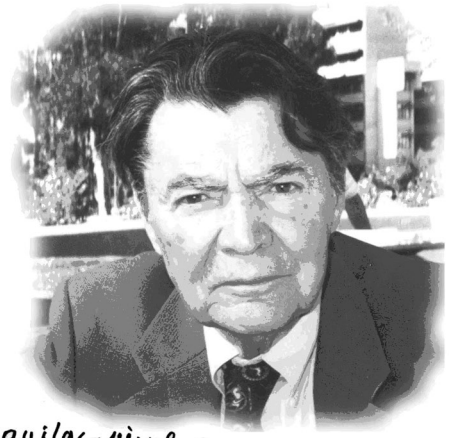
„Cercetarea ştiinţifică este mai mult decât o profesie, este un mod de a trăi, cu strădanii reuşite alături de încercări nereuşite, iar între ele marea agitată a îndoielilor care te invită la înţelepciune”.

„Nu se poate construi nimic durabil, dacă în materialul de construcţie nu este adăugat «quantum satis» - suflet. Fără dăruire nu poţi deveni niciodată ceea ce admiri”.

PROF. NICOLAE SIMIONESCU

LA ÎNCEPUT A FOST IDEEA...VISUL

Cu mult timp înainte de a deveni realitate, în 1971 Nicolae Simionescu și Maya Simionescu au visat la înființarea Institutului.



A început ca un vis -
au trecut ani,
dar - cu trecerea anilor - visul a
prins încet, dar sigur, viață.
Și a deschis într-adevăr
o fereastră spre viitor.
Prin sprijin de sus,
prin eforturile fiecăruia în
colțul laboratorului lui - sau ei -,
Visul trăduș în viață o dă de
transforme sigur în fapte, în
împliniri ce vor încălzi inima
Viitorului.

Sept 8. 79 G. E. Palade

EVOCĂRI ALE CELOR CARE CARE AU VISAT: NICOLAE ȘI MAYA SIMIONESCU

„Ideea (1970) s-a cristalizat într-o perioadă lungă în timpul căreia am avut o extraordinară colaborare de 10 ani cu Profesorul George Palade la Universitățile Rockefeller și Yale din SUA".

„...încă de la bun început ideea noastră de bază a fost pur și simplu să ne formăm acolo și să ne întoarcem în țară și să facem o casă. Sentimentul acesta al instituției a fost foarte puternic la noi și e foarte puternic și acum. Credem, și eu si Maya, în puterea instituțiilor. Trebuie să faci o casă, trebuie să ai o grădină în care să pui un pom. Trebuie să ai o casă ... pe care să o înzestrezi cu tot ce este necesar pentru a putea, în felul acesta, să crești niște oameni în jurul tău. Niste oameni deosebiți. Să faci, ceea ce se spune în termeni mai pedanți, o școală. O școală pe care s-o ridici la rangul de instituție".

„Și, la un moment dat, în 1972, într-o suită de împrejurări care sunt foarte amuzante, m-am așezat, împreună cu Maya, în fața unei hârtii de împachetat și am spus, și unul și altul, în același timp: «Hai să facem un centru modern de biologie celulară, să adunăm niște tineri în jurul nostru, să-i formăm ca un fel de familie și să asigurăm, astfel, o oază de muncă și de liniște și de seriozitate»".

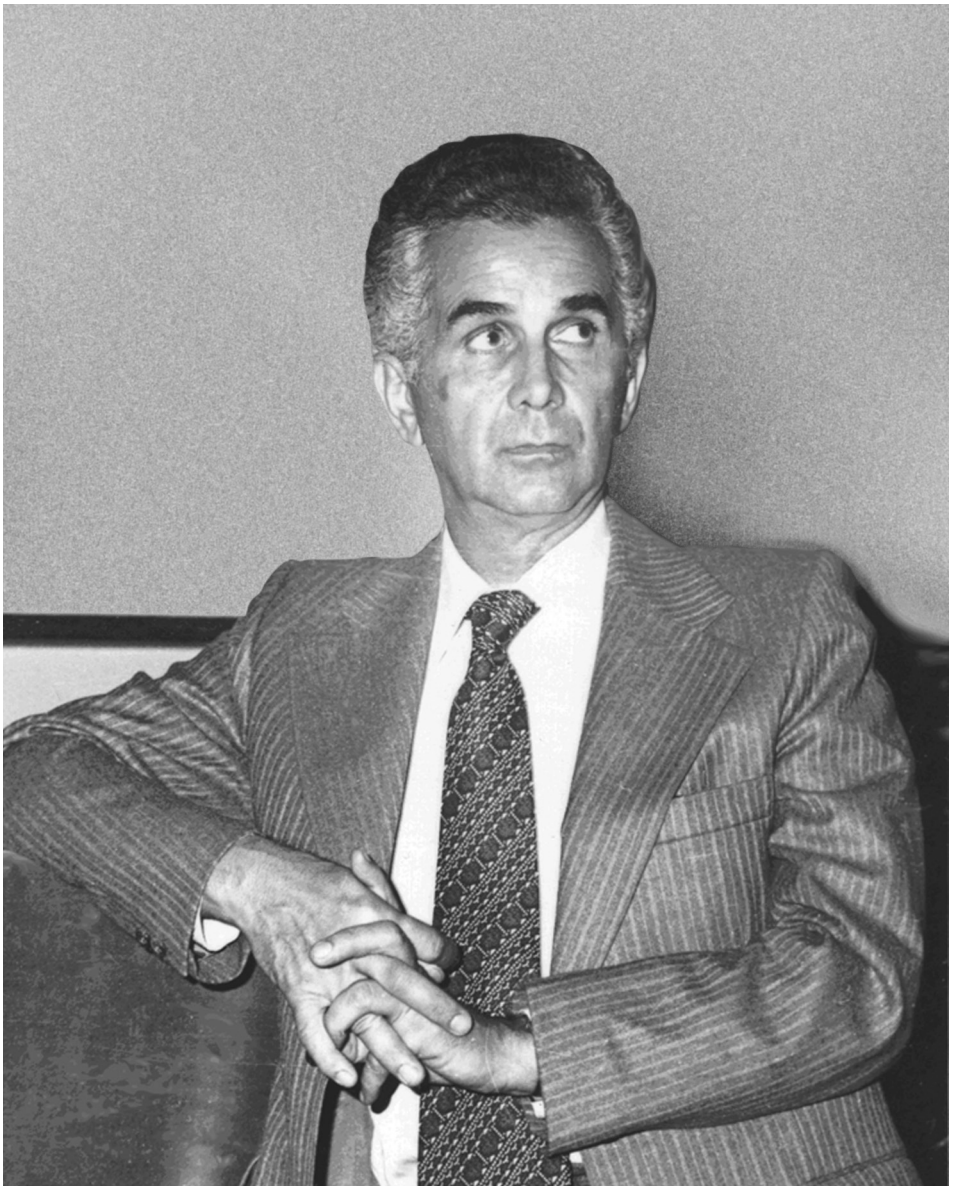
„Dorința noastră a fost să creem un loc unde cercetătorii tineri din România să aibă șansa să își demonstreze talentul și la o scară mai largă, să dezvoltăm biologia celulară la noi în țară".

„Ne-am hotărât să ne concentrăm pe o temă care este științific și socio-economic semnificativă: să descifrăm la nivel celular și molecular funcționarea sistemului cardiovascular în condiții normale și patologice și prin rezultatele noastre să contribuim la combaterea principalei cauze de mortalitate în lume, bolile cardiovasculare".

EVOCAREA CELUI CARE I-A SPRIJINIT PE „VISĂTORI": PROFESORUL GEORGE E. PALADE

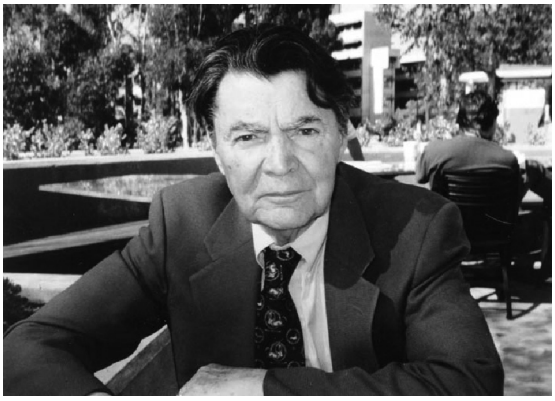
„Între experimente și găsirea unor noi trasori, între sortarea pozelor de microscopie și elaborarea unor lucrări, Nicolae și Maya Simionescu au început să lucreze la planurile unui nou laborator care urma să se construiască în București. Inițiativa a fost în întregime a lor. Rolul meu în această nouă aventură a fost să găsim împreună modalități care să asigure viabilitatea acestui Institut Român. Obiectivul principal era de a se preveni izolarea și de a asigura o colaborare continuă."

OMAGIU PROFESORULUI NICOLAE SIMIONESCU



La 6 februarie 1995,
Profesorul Nicolae Simionescu a trecut din plină activitate în legendă...

NICOLAE SIMIONESCU - O VIZIUNE EXIGENTĂ , DAR LUMINOASĂ PENTRU VIITORUL ȘTIINȚELOR BIOMEDICALE ÎN ROMÂNIA



PROFESOR
GEORGE E. PALADE
Laureat al Premiului Nobel
pentru Medicină
University of California,
San Diego, USA

Evenimentul tragic al sfârșitului neașteptat și prematur al vieții unui om ajuns pe culmile cele mai înalte ale activității sale, crează condițiile ce dezvăluiesc adevărata măsură a valorii sale. Zgomotul de fond ce însoțea activitățile lui zilnice este înlocuit de tăcere, iar relațiile complexe de ambiții și interese comune sau opuse dau loc unui gol pe care se proiectează în lumină puternică și într-un contrast izbitor silueta celui dispărut.

Nicolae Simionescu a murit subit în somn, răpus cu blândețe de boala pentru studiul căreia și-a dedicat o mare parte din viață. El era într-adevăr ajuns pe vârful remarcabilei lui cariere în cercetarea biomedicală. Prin trecerea lui din viață, atât el, cât și comunitatea științifică românească au pierdut realizarea multor idei ce încă germinau în mintea lui. Nu putem măsura pierderile, dar putem evalua realizările avute înainte de plecarea sa bruscă și putem accepta cu respect și venerație moștenirea pe care a lăsat-o comunității românești.

EDUCAȚIA. Nicolae Simionescu a fost produsul sistemului de educație românesc din perioada interbelică. A absolvit Liceul „Sf. Andrei" în 1944 și, în același an, a intrat la Facultatea de Medicină „Carol Davila" a Universității din București, ale cărei cursuri le-a urmat într-o perioadă de rapide și drastice schimbări politice și sociale, cauzate de comunizarea și satelizarea treptată a țării de către politica oarbă și implacabilă a Sovietelor. Mulți români au fost captați de puterea roșie, dar mulți, precum el, au reușit să-și păstreze un „status intern" și o imagine a ceea ce trebuie să facă pentru a nu pierde respectul de sine.

ÎNCEPUTURILE ACTIVIȚĂTII DE CERCETARE.

Încă de pe băncile facultății, Nicolae Simionescu a lucrat ca intern/rezident în chirurgie, iar, după absolvire, ca preparator la Clinica de Chirurgie a Prof. Dr. Ion Juvara. Judecând după viile lui amintiri legate de muncă, aventurile și poznele din această clinică, e cert, că a avut o perioadă de activitate minunată în acel serviciu. În aceeași perioadă lucra și la Catedra de Anatomie, ca preparator apoi ca asistent universitar și aici, animat de curiozitatea înnăscută a omului de știință în devenire, a studiat și prezentat o serie de particularități în organizarea vasculaturii unor organe ca splina, rinichiul și pancreasul.

În 1957, s-a mutat de la chirurgie la Institutul de Endocrinologie - condus la vremea aceea de Ștefan Milcu - ca cercetător principal și conducător al Secției de Morfologie. În perioada aceea, curiozitatea lui înnăscută, s-a concentrat pe câteva subiecte bine alese, iar rezultatul s-a concretizat într-o serie de lucrări importante asupra glandei suprarenale și o monografie publicată în Anglia asupra morfologiei normale și patologice a glandei tiroide. La Institutul de Endocrinologie, Nicolae Simionescu a întâlnit-o pe Maya, o remarcabilă tânără cercetătoare de sine stătătoare, care a devenit colaboratoarea lui constantă și, mai târziu, soția lui.

În 1966, după mai mult de 20 de ani de la plecarea mea din România, m-am întors în țara mea de origine, ca membru al unei delegații a Academiei Naționale de Științe a Statelor Unite pentru a negocia o înțelegere de schimburi științifice cu Academia Română. În acea perioadă, guvernul comunist al României încerca să obțină o margine de independență față de Uniunea Sovietică prin deschiderea unor ferestre către vest. Viața era încă grea în România, dar cel puțin era evident la orice nivel, de la oficialitățile guvernamentale la profesori universitari și până la cetățenii de rând, că românii erau hotărâți să-și afirme și să-și apere identitatea națională și erau pregătiți să recunoască existența unor gradiente economice și științifice și să încerce să stabilească contacte cu restul lumii dincolo de considerațiile doctrinelor politice.

PERIOADA ROCKEFELLER. Am socotit că laboratorul nostru la Universitatea Rockefeller ar putea încuraja această „deschidere către vest" și am hotărât să invit un cercetător român tânăr să lucreze în grupul nostru, la New York. Îl cunoșteam pe Nicolae Simionescu din perioada studenției și i-am cerut sfatul vechiului meu prieten și coleg de clasă, Ion (Cuti) Juvara și răspunsul lui fiind entuziast, l-am invitat pe Nicolae Simionescu să vină la Universitatea Rockefeller. El a acceptat fără întârziere, cu toate că postul pe care-l puteam oferi - asistent de cercetare - era cu câteva trepte sub poziția de conferențiar pe care o avea la București.

În perioada aceea, laboratorul de Biologie Celulară al Universității Rockefeller era la apogeul activității lui, care începuse spre sfârșitul decadei 1940 și a progresat în mod impresionant în decadele următoare. În acel laborator, care a fost recent descris ca „leagănul biologiei celulare moderne", Nicolae Simionescu s-a alăturat generației lui Gunter Blobel, David Sabatini, Marilyn Farquhar și James Jamieson, actualii conducători ai biologiei celulare americane. El li s-a alăturat cu ușurință și grație, chiar dacă

majoritatea noilor săi colegi aveau dificultăți la pronunțarea numelui. Adeseori suna mai mult ca Simonoseki decât Simionescu.

STUDIUL ENDOTELIULUI CONTINUU. Împreună am decis să studiem organizarea și funcțiile endoteliului vascular, în mod deosebit a endoteliului continuu din musculatura corpului, din inimă și plămâni. Rezultatele anterioare ale laboratorului duseseră la descoperirea unor noi structuri denumite vezicule plasmalemale, iar studiile efectuate în anii 1960 sugeraseră implicarea lor în transportul macromoleculelor (feritină) prin stratul endotelial al peretelui vascular. Dar multe rămăseseră de făcut pentru a defini în detaliu, structura capilarelor sanguine și a altor segmente ale microvasculaturii și pentru a cerceta mai departe, funcția veziculelor plasmalemale. Acest domeniu a devenit feuda științifică a lui Nicolae Simionescu. Lucrul a demarat prompt și a progresat repede, dar exista totuși un element care afecta dureros situația general: Maya Simionescu era încă în București. O serie de cereri insistente au reușit, în final, să o aducă la Universitatea Rockefeller, fapt ce a însemnat încă un asistent de cercetare român și un progres mai rapid al proiectului nostru. De asemenea, a însemnat fericire.

Nicolae și Maya Simionescu s-au instalat în campusul Universității și munceau în mod febril zi și noapte (sau cel puțin până seara târziu) pentru a face față competiței formidabile din domeniul nostru de cercetare. Pe de-o parte, specialiștii în fiziologia capilarelor care dominau intelectual scena - pretindeau că toate schimburile transcapilare aveau loc prin pori situați de-a lungul joncțiunilor intercelulare și considerau alternativa transportului prin vezicule plasmalemale ca foarte puțin probabilă, dacă nu chiar imposibilă. Pe de-altă parte uneltele de lucru și procedurile experimentale existente la acea vreme, nu erau suficient de rafinate pentru a produce rezultate acceptate și convingătoare pentru biologii celulari. Nicolae Simionescu a utilizat o serie de trasori de diferite dimensiuni, toți fiind selectați pentru detecția porilor mici, postulați de specialiștii în fiziologia capilarelor, deoarece, acești pori erau în acea perioadă, principalul obiect de interes. Fundamentarea studiilor era clară și adeseori elegantă, dar competiția a rămas neconvinsă.

DESCOPERIREA CANALELOR TRANSENDOTELIALE. Studiile efectuate în acea perioadă au produs totuși un rezultat satisfăcător, important: descoperirea canalelor transendoteliale formate de vezicule plasmalemale fuzionate simultan cu ambele fețe (luminale și abluminale) ale plasmalemei endoteliale. Existența acestor canale a fost stabilită în mod convingător de Nicolae Simionescu. De asemenea, importante au fost studiile lui, în care a identificat segmentele diferențiate ale microvasculaturii din diafragm și a descoperit joncțiuni deschise focale în endoteliul venulelor postcapilare.

PERIOADA YALE. În 1973 grupul nostru, inclusiv Nicolae și Maya Simionescu, s-a mutat de la Rockefeller la Yale Medical School unde a pus bazele

unei noi Secții de Biologie Celulară. Studiile asupra vaselor sanguine au continuat fără întrerupere în aceste noi laboratoare. Lucrările lui Nicolae Simionescu s-au focalizat clar pe endoteliul vascular dar, așa cum era de așteptat din partea unui om de știință, cu adevărat plin de resurse, cercetările lui au acoperit un spectru larg de teme, începând de la tehnici noi de fixare a țesuturilor și mordansare (cu galoilglucoză) pentru obținerea unui contrast optim, la noi trasori (particule de dextran și glicogen), la încercări reușite de a izola microvasculatura din miocard și mergând până la noi tehnici de studiu a joncțiunilor intercelulare (replici de specimene obținute din înghețare-fracturare). Toate aceste studii experimentale au fost efectuate în colaborare cu Maya Simionescu care adeseori a fost prim-autor.

La acea vreme, Nicolae și Maya erau deja recunoscuți ca biologi celulari de frunte specializați în studiul endoteliului vascular și în această calitate reprezentau laboratorul nostru la diferite conferințe și întâlniri în Mexic și Japonia.

Ceea ce era remarcabil este faptul că de îndată ce schițam un domeniu de cercetare, studiile erau rapid și eficient realizate și extinse până la limita permisă de tehnologia zilei. Așa s-a întâmplat în cazul joncțiunilor endoteliale și al câmpurilor vasculare bipolare în diafragm. Și tot așa s-a întâmplat câțiva ani mai târziu când au fost descoperite microdomeniile diferențiate ale plasmalemei endoteliale.

UN NOU INSTITUT ÎN BUCUREȘTI. După mutarea la Yale, o altă preocupare majoră a intrat în viața lui Nicolae Simionescu fiindcă el socotea că un Institut de Biologie și Patologie Celulară trebuie realizat și poate fi realizat la București. Modelele lui au fost cele două laboratoare de biologie celulară în care a lucrat în Statele Unite (Universitățile Rockeffeler și Yale) și Institutul Internațional de Biologie și Patologie Celulară fondat de Christian de Duve în Belgia. Astfel, printre experimente, descoperiri de noi trasori, selecționări de microfotografii și redactări de manuscrise, Nicolae Simionescu a început să lucreze la planurile unui nou laborator care urma să fie construit în București. Inițiativa i-a aparținut în întregime. Rolul meu în aceast nou proiect a fost de a găsi, împreună cu el, căile și mecanismele care să asigure viabilitatea acestui institut în România. De la început a fost nevoie de o legătură oficială cu o universitate americană. Yale Medical School a devenit partenerul american, iar Universitatea din București cel român. Apoi a fost necesară realizarea și semnarea unei convenții oficiale între cei doi parteneri. Obiectivul principal era prevenirea izolării și asigurarea unei colaborări continui. Convenția prevedea ca Nicolae și Maya Simionescu să funcționeze anual câte trei luni la Yale, participand la activitați didactice și de cercetare, și nouă luni la București la noul institut. Planurile au fost definitivate, convenția a fost semnată și institutul a fost construit, bine echipat și inaugurat în 1979. Mai mult decât atât, folosindu-și bine noile relații științifice din Statele Unite și profitând de disponibilitatea Burselor Fullbright, Nicolae Simionescu trimisese deja un prim grup de tineri români, bărbați și femei, pentru a se perfecționa în laboratoare de frunte în străinătate în domenii alese cu multă atenție. Ei s-au întors la București gata pentru începerea activității în propriul lor Institut.

MICRODOMENII DIFERENȚIATE. În primii ani lucrurile păreau să meargă fără dificultăți. Nicolae și Maya au organizat o excelentă echipă de lucru în România, și au putut să sosească la timp la Yale pentru a-și îndeplini obligațiile ca profesori asociați (visiting professors). Amândoi s-au dovedit a fi excelenți dascăli, atât în laborator, cât și în sălile de curs. Mai mult decât atât, studiile experimentale la Yale s-au îndreptat în direcții noi, interesante și promițătoare. Au fost descoperite microdomenii diferențiate pe aspectul luminal și abluminal al plasmalemei endoteliului fenestrat și continuu, folosind ca probe, feritina cationizată și diferite lectine, și parte din moleculele implicate în aceste diferențieri au fost identificate în urma tratamentelor cu enzime specifice. Elementul cel mai important în aceste noi descoperiri a fost faptul că aceste microdomenii diferentiate chimic, corespundeau unor elemente structurale bine definite. Mai mult, rezultatele au sugerat clar că veziculele plasmalemale au compoziția chimică de suprafață necesară pentru a transporta proteine plasmatice, cunoscute ca fiind în majoritatea lor specii de tip anionic.

Proiectul privind domeniile microdiferențiate a fost un alt exemplu de activitate dusă la bun sfârșit prompt și cu mare eficiență de către Nicolae și Maya Simionescu. La Universitatea Yale și la IBPC proiectul acesta a fost aprofundat și extins și la alte tipuri de endotelii. Același protocol de bază a fost aplicat pentru localizarea receptorilor pentru histamină pe suprafața endotelială, folosind conjugate de histamină-feritină.

NOI TRASORI. Ambele laboratoare au dezvoltat apoi o nouă direcție de cercetare, derivată în parte din studiul microdomeniilor diferențiate și bazată pe ipoteza că proteinele plasmatice ar putea constitui trasori mai potriviți decât peroxidazele (folosite la acea vreme) pentru a demonstra în continuare rolul veziculelor plasmalemale în schimburile dintre plasmă și fluidele interstițiale. Erau necesare, însă, noi metode pentru a evidenția acești trasori mai puțin problematici și mai fiziologici. Primul pas important făcut la IBPC a fost localizarea preluării lipoproteinelor de joasă densitate de către veziculele plasmalemale ale endoteliului vaselor mari ca și de acela din vasa vasorum. Descoperirea a reprezentat o deschidere nouă spre vastul domeniu al aterosclerozei și bolilor cardiovasculare, domeniu care a devenit în anii următori scopul major al eforturilor de cercetare din Institutul de Biologie și Patologie Celulară.

Al doilea pas important a fost întroducerea complexelor de aur coloidal-albumină ca trasori care puteau fi identificați individual în specimene microvasculare, bine prezervate morfologic. Activitatea aceasta s-a desfășurat în paralel la Yale și la IBPC, dar Nicolae și Maya Simionescu susținuți de colaboratori competenți, au avansat mai repede și au diversificat investigațiile incluzând, în afara albuminei simple, albumina glicată și complexele de albumină-acizi grași în repertoriul proteinelor folosite pentru conjugare cu particule de aur coloidal. De data aceasta, rezultatele erau deasupra oricăror dubii. Toți acești trasori erau preluați de către veziculele plasmalemale și descărcați de ele, pe partea opusă a endoteliului printr-un proces pentru care Nicolae Simionescu introdusese deja termenul de transcitoză.

Validitatea vechii ipoteze, a transportului prin vezicule plasmalemale a fost în mod convingător stabilită de noile rezultate, dar aspecte importante deși subsidiare rămăseseră fără răspuns. Toate complexele albumină-aur reprezentau probe exclusive pentru ipoteticul sistem al porilor mari: din punct de vedere fiziologic sistemul porilor mici era mai important. Mai mult, complexele reprezentau probe experimentale și interacția lor cu endoteliul nu era în mod necesar aplicabilă și albuminei monomerice. Acestei probleme i s-a dat în final un răspuns în laboratorul de la Yale, unde s-a demonstrat (imunocitochimic, folosind complexe aur-anticorpi pe secțiuni fine la gheață din inima de șoarece) că veziculele plasmalemale sunt clar implicate în transcitoza albuminei monomerice native.

Rezultatele obținute cu trasorii albumină-aur l-au îndemnat pe Nicolae Simionescu să postuleze existența unor proteine de legare a albuminei la nivelul plasmalemei endoteliale, posibil implicate în transcitoză. Cercetările ulterioare din IBPC au identificat de fapt patru proteine, dar deoarece ele au fost găsite de asemeni, în multe alte tipuri celulare, altele decât cele endoteliale, rolul lor funcțional urmează a fi elucidat, prin noi cercetări experimentale.

RECUNOAȘTEREA MONDIALĂ. În decada 1980, Nicolae și Maya Simionescu au ajuns să fie recunoscuți pe plan mondial, ca lideri în cercetarea endoteliului vascular și IBPC a ajuns să fie unanim considerat, ca un important centru de avangardă în acest domeniu. Ambele poziții au fost consolidate în continuare de cercetările modificărilor incipiente care afectează peretele vaselor mari, susceptibile de a dezvolta leziuni ateromatoase. Recunoașterea largă s-a materializat în invitații ca profesori asociați (visiting professors) la Universitățile McGill, Columbia și la Universitatea din California la Los Angeles, și de asemenea în invitații de a participa practic vorbind la toate conferințele asupra endoteliului organizate pe ambele maluri ale oceanelor Pacific sau Atlantic.

În termeni practici însă, cel mai important semn al recunoașterii mondiale, au fost cele trei granturi (timp total de 9 ani) acordate de NIH, pentru IBPC, la solicitarea lui Nicolae Simionescu. Au fost primele și singurele granturi acordate unui institut de cercetare din Europa de Est, într-o perioadă în care granturile acordate unor institute din afara SUA reprezentau doar un foarte mic procent din total. Aceste granturi au făcut posibilă achiziționarea de chimicale și echipamente de pe piața vestică și organizarea de simpozioane internaționale la IBPC pe teme de interes general în biologia endoteliului, inclusiv transcitoza proteinelor și lipoproteinelor și rolul lor în dezvoltarea leziunilor aterosclerotice. La aceste conferințe au participat cercetători americani de înalt prestigiu din fiecare domeniu menționat mai sus, în acele vremuri, conferințele acestea erau printre puținele ocazii în care tinerii cercetători români din IBPC și alte instituții au avut posibilitatea de a se întâlni cu „nume" de care aflaseră în revistele științifice și de a purta discuții cu ei.

La sfârșitul decadei 1980, dificultăți diferite au început să-și facă apariția la orizont. Întâi, autoritățile române au devenit din ce în ce mai reticente în acordarea

vizelor de ieşire din ţară pentru Nicolae şi Maya Simionescu. Noi nu mai puteam conta pe sosirea lor la timp pentru perioada celor trei luni la Yale. Apoi facilităţile şi personalul nostru tehnic de la Yale nu mai erau pe măsura celor de care Nicolae şi Maya dispuneau la IBPC. În fine, tinerii membri ai laboratoarelor începuseră să piardă din vedere raţiunile acordurilor iniţiale. IBPC nu mai era considerat ca un institut în dezvoltare, ci ca un competitor matur şi eficient. Ceea ce însemna, de fapt, că experimentul iniţial şi cel mai important, care fusese crearea IBPC-ului, reuşise pe deplin. În final, guvernul român a refuzat prelungirea convenţiei de colaborare.

CONTRIBUŢII GENERALE LA LITERATURA ŞTIINŢIFICĂ. Nicolae Simionescu iubea activitatea de dascăl şi avea un dar deosebit de a organiza şi sistematiza informaţia ştiinţifică. Acest talent l-a folosit cu succes la redactarea împreună cu Maya Simionescu a unor capitole din tratate americane de histologie, a unor lucrări de sinteză asupra organizării şi funcţionării endoteliului şi de asemenea la editarea a două volume succesive, deosebit de utililizate, asupra funcţiilor normale şi disfuncţiilor celulei endoteliale.

CERCETAREA ÎN ATEROSCLEROZĂ. În prima parte a anilor 80, Nicolae Simionescu a iniţiat în IBPC, o direcţie de cercetare cu totul nouă, ca răspuns la importantele descoperiri rezultate în studiul particulelor lipoproteice şi dezvoltării leziunilor aterosclerotice, făcute în alte laboratoare. Undeva în adâncurile spiritului lui, exista un profund şi constant interes pentru patologia experimentală care acum ieşea la suprafaţă cu o forţă suficient de puternică pentru a deveni una din liniile dominante de cercetare în IBPC.

Această nouă direcţie de cercetare a produs un nou model experimental, hamsterul cu leziuni ateromatoase induse printr-o dietă bogată în lipide şi colesterol. S-a concentrat asupra modificărilor incipiente care preced leziunile ateromatoase observabile: a demonstrat că hipercolesterolemia determină modificări în chimia suprafaţei endoteliului şi a intimei arterelor susceptibile la ateroscleroză şi de asemenea a evidenţiat că lipoproteinele, apolipoproteinele şi liposomii (descoperite la IBPC) se acumulează în matricea extracelulară a intimei. Aceşti liposomi (lipoproteine modificate) au fost izolaţi şi parţial caracterizaţi. Prezenţa lor a fost iniţial o surpriză în patologia vasculară, dar mai târziu liposomii extracelulari au fost detectaţi şi de alte grupuri implicate în cercetarea aterosclerozei experimentale.

LA COLUMBIA COLLEGE OF PHYSICIANS AND SURGEONS. La începutul anilor ‘90, Nicolae şi Maya Simionescu, menţinând legătura lor cu Universitatea Yale, au iniţiat o colaborare sustinută cu cercetători (S. Silverstein şi D. Stern) din Departamentul de Fiziologie al Universităţii Columbia. Parte din activitate s-a concentrat în continuare asupra modificărilor endoteliale din ateroscleroza incipientă şi asupra localizării receptorilor endoteliali pentru produşii de glicare avansată a proteinelor sanguine, un aspect de o deosebită importanţă în complicaţiile

cardiovasculare ale diabetului. O altă parte a acestei activități a fost realizarea unei proceduri reușite, ingenioase și interesante de radioiodinare a proteinelor veziculelor plasmalemale folosind complexe aur-albumină suplimentate cu lactoperoxidază urmată de substanțele cerute pentru radioiodinare. Metoda este de mare actualitate, dată fiind intensitatea interesului actual în biochimia caveolelor (o altă denumire dată veziculele plasmalemale).

IBPC DUPĂ 1989. Căderea regimului comunist la sfârșitul anului 1989 a permis ca numeroase idei, dorințe și inițiative îndelung supresate, să răbufnească la suprafață ca parte a unui sindrom general de decomprimare. La IBPC rezultatul a fost că mulți dintre tinerii cercetători au plecat în căutarea unor noi posibilitați de afirmare în străinătate, în Franța, Germania, Anglia și Statele Unite. Majoritatea prestează o activitate de înaltă calitate și găsesc poziții bune în cercetarea științifică, mulțumită experienței dobândite în IBPC alături de Nicolae și Maya Simionescu. În același timp IBPC a reușit deja, să recruteze și să pregătească o nouă generație care promite să fie la fel de bună, dacă nu chiar mai bună decât prima.

ACADEMIA ROMÂNĂ. În 1990 Nicolae și Maya Simionescu au fost aleși membri corespondenți ai Academiei Române. In 1991 au devenit membri plini și în 1994, Nicolae Simionescu a fost ales Vice-Președinte al Academiei Române. A acceptat aceste noi responsabilități cu sentimentul că are misiunea de a îmbunătăți condițiile și nivelul de suport al cercetării fundamentale și aplicate în științele biomedicale din România. A considerat că ceea ce este valabil și reușit în organizarea sistemului de cercetare științifică din țările vestice, trebuie avut în vedere și, dacă este posibil, adaptat necesităților comunității științifice românești și de asemeni, realităților economice din România. Anul trecut Academia a inițiat primul sistem de granturi competitive pentru cercetare. A fost primul pas pe care Nicolae Simionescu și noua conducere a Academiei Române l-au făcut în direcția unui viitor mai luminos.

ÎN LOC DE CONCLUZII. Nicolae Simionescu a avut o carieră meteorică. În zece ani, pornind cu o inteligență sclipitoare și o educație generală valoroasă a devenit o autoritate deplină și unanim recunoscută în biologia celulară a endoteliului vascular. In decada următoare și în continuare, în condiții sociale și politice nesigure și dificile, a organizat un institut de cercetare și a pregătit o întreaga echipă de cercetători capabili, iar în următorii cinci ani și-a asumat o poziție de conducere în Academia Română, cea mai înaltă instituție care ghidează activitatea de creație a țării. În fiecare etapă în această rapidă evoluție, a lăsat în urmă o moștenire durabilă: realizările cercetărilor lui științifice, Institutul de Biologie și Patologie Celulară - două generații de cercetători bine pregătiți - și o exigentă dar luminoasă viziune asupra viitorului științelor biologice și biomedicale în România.

ROMÂNIA A PIERDUT PE UNUL DINTRE CEI MAI DISTINȘI FII AI SĂI, DAR S-A ÎMBOGĂȚIT CU O PREȚIOASĂ MOȘTENIRE

PROFESOR GUIDO MAJNO
University of Massachusetts, Worcester, USA

Îmi vine greu să cred că mă aflu în situația de a-mi așterne în scris gândurile pentru comemorarea lui Nicolae Simionescu. Ce pierdere teribilă pentru România, pentru știință, pentru nedespărțita sa Maya, și pentru acei nenumărați dintre noi care l-au iubit și admirat! Nu mi-aș fi putut închipui vreodată că poate exista o lume fără el, în așa mare măsură a făcut parte din viețile noastre, fiind atât de necesar pentru mulți dintre noi. A fost o personalitate unică în multe privințe. Pentru soția și colaboratoarea mea Dr. Isabelle Joris și pentru mine, întâlnirile noastre anuale cu familia Simionescu, de obicei în Statele Unite, deveniseră un ritual pe care-l anticipam cu mare bucurie și nerăbdare, ca pe o transfuzie de idei și o posibilitate de a face o incursiune imaginară în știința viitorului. Nimic nu va putea înlocui aceste ocazii.

Încercând să-mi transpun durerea în vorbe, un cuvânt îmi izvorăște în minte: Eroism. Nicolae Simionescu ne-a lăsat un minunat exemplu de eroism în viața publică și particulară. Nicolae și Maya ar fi putut beneficia de oricare dintre confortabilele poziții academice din Statele Unite, dar ei au ales calea cea mai dificilă, cea de a-și ajuta propria țară (și iată că din nou mă surprind vorbind de Nicolae și Maya împreună, căci într-adevăr ei formau o unitate).

Nicolae a fost un cetățean al planetei, dar el a fost în primul rând Român prin toată ființa sa, până la ultima sa celulă. Și-a consacrat întreaga energie edificării in România a unei insule de excelență - la nivel mondial - și a realizat aceasta în ciuda unor enorme dificultăți, suferințe și chiar pericole personale. Protejat de extraordinara sa prestanță, de statura lui științifică și de inspirata sa imaginație, s-a luptat pentru viitorul tinerilor români zi de zi, asumându-și personal riscuri.

Din punct de vedere științific formația sa a fost unică, combinând medicina

experimentală, endocrinologia, chirurgia cu anatomopatologia de diagnostic, discipline pe care le-a practicat la Institutul de Endocrinologie din București, timp de 18 ani, urmați apoi de alți zece ani de pregătire în laboratorul unuia dintre fondatorii biologiei celulare, laureatul Premiului Nobel, George E. Palade. S-a îndrăgostit - ca de altfel atâția alții înainte și după el -, de celulele care căptușesc vasele sanguine și ne separă de „oceanul nostru interior", celulele endoteliale.

Apoi, în 1979, s-a întors la București, pentru a conduce un nou institut pe care l-a plănuit cu grijă și l-a desemnat a fi un nou „paradis" al biologiei celulare. Credincios dublei sale formații de Doctor în Medicină și de Doctor în Științe, l-a denumit Institutul de Biologie și Patologie Celulară, singurul institut cu această titulatură existent, după câte știu, în lumea întreagă. Trebuie să fi fost o experiență inspirată, cea de a da o orientare unei echipe formate din 86 oameni, dintre care 19 foarte tineri și însetați de cunoaștere, dar relativ ne-experimentați cercetători. Acesta a fost doar începutul.

Foarte curând grupul s-a extins la 130 membri, selecționați în urma discuțiilor purtate cu peste 1300 de candidați. Cu 30 de ani în urmă, un alt mare cercetător, Peter Medawar, a denumit știința ca „artă a soluțiilor", înțelegând prin aceasta faptul că etapa esențială în practicarea științei este talentul de a aborda doar acea problemă care este rezolvabilă cu mijloacele accesibile. Nicolae Simionescu a procedat întocmai și a ales să concentreze activitatea întregului institut asupra unei singure probleme: biopatologia celulară și moleculară a sistemului cardiovascular, și în particular a endoteliului și a rolului lui esențial în patologie, anume ateroscleroza. A fost o alegere inspirată; nicăieri în lume nu mai există un grup atât de puternic capabil să abordeze ateroscleroza din atâtea puncte de vedere ale biologiei celulare, incluzând biochimia, biofizica, fiziologia, patologia, culturile de țesuturi și microscopia electronică.

Timpul a dovedit că Nicolae Simionescu a ales soluția cea bună (chiar dacă a trebuit să se lupte cu foarte mari dificultăți, cum ar fi instabilitatea tensiunii electrice, fapt care a făcut ca microscopia electronică să fie impracticabilă o perioadă destul de lungă). Curând institutul a produs rezultate științifice care au avut rezonanță în întreaga comunitate științifică și în orice discuție despre ateroscleroză, vase sanguine și endoteliu, nimeni nu se putea considera informat la zi, fără a fi la curent cu ultimele descoperiri ale lui Nicolae și Maya Simionescu și a colectivului lor.

Printre realizările științifice ale lui Nicolae Simionescu și ale perseverentei sale echipe, voi menționa doar câteva pe care le găsesc deosebit de importante:
(a) demonstrarea definitivă, împreună cu G.E. Palade, a faptului că permeabilitatea endotelială variază atât de-a lungul întregului arbore vascular precum și la nivelul unei singure celule endoteliale;

(b) evidențierea faptului că celula endotelială prezintă receptori pentru albumină pe care aceasta îi folosește în transportul transendotelial al acestei proteine, o descoperire care a fost considerată ca cea mai importantă contribuție adusă fiziologiei endoteliului de la descoperirea legii lui Starling, sau mai bine spus de când George Palade a demonstrat existența transportului vezicular;
(c) demonstrarea faptului că receptorii pentru histamină sunt concentrați în special în venule - spre deosebire de arteriole și capilare - explicând topografia predominant venulară a creșterii permeabilității vasculare în inflamație, un fenomen care i-a intrigat pe patologi aproape un secol;
(d) descoperirea faptului că primul fenomen demonstrabil în ateroscleroză este „pomparea" lipidelor de către endoteliu în spațiul subendotelial, observație care a fost publicată în revista American Journal of Pathology și a oferit o perspectivă cu totul nouă în modul nostru de a privi ateroscleroza;
(e) introducerea denumirii de transcitoză, a fost o idee genială. Conceptul de transport transendotelial prin vezicule plasmalemale a fost propus de către George Palade cu 30 de ani urmă, dar din motive greu de înțeles a întâmpinat o rezistență considerabilă. Nicolae Simionescu i-a atribuit o denumire care, relevând semnificația generală, a determinat ca aproape imediat fenomenul să fie acceptat ca o realitate. Legat de acesta, conceptul de transcitoză mediată de receptori a fost introdus de către Nicolae Simionescu;
(f) monografiile asupra endoteliului normal și patologic editate de Maya și Nicolae Simionescu au devenit referințe bibliografice de bază în literatura de specialitate internațională.

Contemplând asupra dimensiunii acestei pierderi pentru noi, singurul gând, singura consolare la care mă pot gândi - și este una puternică, rămâne faptul că Nicolae a îmbogățit în permanență viețile noastre. Cei ce au avut privilegiul de a-l cunoaște personal, vor păstra printre amintirile lor cele mai dragi, sclipirile imbatabilului său simț al umorului, care nu l-a părăsit nici chiar în cele mai dificile momente. Deși pentru comunitatea științifică internațională, el a reprezentat chintesența cercetătorului autentic, în viața sa particulară a găsit timpul necesar să compună muzică la pian, să picteze și să scrie poezii, fiind și în aceste domenii un admirabil model pentru mai tinerii săi colaboratori.

Printre darurile concrete, Nicolae Simionescu ne-a lăsat un monument viu, Institutul de Biologie și Patologie Celulară, un institut cu o denumire și o misiune științifică frumoasă. Și mai presus de toate, pentru români și pentru cercetătorii din întreaga lume exemplul său de curaj lipsit de compromisuri va continua să dăinuie, căci avem nevoie de eroi mai mult ca oricând în aceste timpuri dificile în care trăim.

Prin dispariția sa, România a pierdut pe unul dintre cei mai distinși fii ai săi, dar în același timp s-a îmbogățit cu o valoroasă moștenire.

NICOLAE SIMIONESCU:
PRIN PROPRIILE CUVINTE... PRIN CUVINTELE CONTEMPORANILOR ...

ACADEMICIAN MAYA SIMIONESCU
Institutul de Biologie și Patologie Celulară
"Nicolae Simionescu"

Încercând să creionez un portret al Profesorului Nicolae Simionescu m-am uitat, firește, în ultimul său Curriculum Vitae și mi-am dat seama cât de puțin spune acesta despre profilul moral și intelectual al unui om atât de complex. Dar ce stă scris, de fapt, în acest Curriculum Vitae? O prodigioasă carieră științifică, cu peste 600 de lucrări publicate (despre care el însuși spunea, cu modestie, „numeric valoric nesemnificativ"), zeci de cărți, tratate, monografii, descoperiri, premii și distincții – numeroase citări în literatura de specialitate. Dar ce nu scrie în acest C.V.? Nu scrie cine era de fapt Omul – Nicolae Simionescu, cel ce era făptuitorul a tot ceea ce era scris. Mie îmi este greu să cuprind în vorbe ce a însemnat Profesorul Nicolae Simionescu. Dar, m-am gândit să îl prezint chiar prin vorbele lui, deși, nici asta nu este ușor, căci, despre el, nu vorbea aproape deloc, nu a apărut niciodată la televizor sau în ziare. La insistențele Domnilor Ioan Longin Popescu și Nicolae Țone, a dat două interviuri, pentru a-l evoca pe Prof. Palade. Ne împărtășea însă, o parte din gândurile lui, la Sesiunile Anuale ale Institutului nostru și ale Societății Naționale de Biologie Celulară, în timpurile grele dinainte de 1989 și după.

Din ceea ce am spicuit din cuvintele sale așternute pe hârtie in diverse ocazii, din luările de cuvânt, precum și din unele date personale la care m-am oprit și pe care vi le voi mărturisi, am să încerc să creionez profilul moral al Profesorului nostru, astfel:

1. Nicolae Simionescu - Omul;
2. Ctitorul Institutului de Biologie și Patologogie Celulară;
3. Creator al școlii naționale de biologie celulară;
4. Cercetătorul și profesorul;
5. Membru și Vicepresedinte al Academiei Române;
6. Nicolae Simionescu: romanticul... gânditor...

1. NICOLAE SIMIONESCU - OMUL

Între 1937-1944 Nicolae Simionescu este elev la Liceul „Dimitrie Cantemir"; bacalaureatul îl ia la Liceul „Sf.Andrei". Este un elev sârguincios, anual premiant.

În 1945 intră la Facultatea de Medicină. După primul an, în urma examenului de anatomie, susținut cu marele anatomist, Profesorul Gr.T. Popa, acesta (cu anticipația caracteristică spiritelor de excepție) îl remarcă și îl reține la catedră. Nicolae Simionescu a avut impresia că nu a știut foarte bine la examen, iar la sfârșit Prof. Gr.T. Popa i-ar fi spus: „dumneata rămâi". I-a fost teamă că asta însemna „dumneata pierzi examenul". Din contră, a însemnat, „dumneata rămâi la catedră". Este student, dar în același timp preparator benevol, apoi preparator la catedra de anatomie, catedră pe care nu o mai părăsește, în fapt, timp de 20 de ani. Când, în 1950, termină facultatea cu diplomă de merit, devine asistent, apoi șef de lucrări și în 1962 conferențiar onorific – tot la anatomie.

La terminarea facultății, prestigiosul chirurg Profesorul Ion Juvara îl invită să lucreze la el, în Clinica de Chirurgie. Acceptă, dar nu renunță la munca didactică. Lucrează simultan, la catedra de anatomie și la Profesorul Juvara, pe care tânărul doctor Simionescu îl admira în mod deosebit, profesional și uman. S-au legat printr-o relație profundă, pe toate planurile, s-au admirat reciproc și au rămas prieteni pe viață.

Dar Nicolae Simionescu dorea, mai mult decât orice, să facă cercetare. Spre uimirea tuturor, după 5 ani, renunță la chirurgie și cere să lucreze in cercetare la Institutul de Endocrinologie. Profesorul Milcu evocă momentul întâlnirii astfel:

„Un tânăr, cu o prezență de o evidentă maturitate, îmi cere să lucreze în cercetare, renunțând la o situație cu posibilități mult mai mari, pentru a se lansa în aventura cercetării științifice, amenințată de numeroase incertitudini".

Devine cercetător și anatomo-patolog la Institutul de Endocri¬nologie unde începe o colaborare de lungă durată și deosebit de fructuoasă cu Prof. Milcu. Acesta îl propune anual la specializări în străinătate. Anual este tăiat de pe toate listele.

În 1969, o invitație total neașteptată sosește de la Prof. George Palade din SUA. Cu dificultate, i se dă aprobarea să plece; se alătură echipei Prof. Palade – 4 ani la Universitatea Rockefeller, New York, urmați de alți 6 ani la Universitatea Yale, New Haven. In acest timp visează, speră și face tot ceea ce este posibil pentru a creia conditiile introducerii biologiei celulare în țară. Dar, asupra aceastei perioade, vom reveni mai târziu, prin cuvintele Prof. Nicolae Simionescu.

După 10 ani, în 1979, se reîntoarce în țară, la institutul pe care împreună l-am visat, creionat, creat și al cărui director va fi timp de 16 de ani. În această perioadă, lucrează anual 9 luni în Romania și 3 luni în SUA, ca „visiting professor" la

Universitățile Yale și Columbia. Muncește enorm în cercetare, organizare, formare de tineri, îmbogățește Institutul și cercetarea noastră... În februarie 1995, trecea pentru ultima oară prin fața Institutului pe care l-a iubit atât de mult dar…, de data asta, însoțit de preoți și de o mulțime care-l plângea....

Dar revin la întrebarea: cine este omul din acest complicat Curriculum Vitae? Cine se ascunde în fapt în spatele atâtor pagini „seci" de realizări științifice, profesionale, sociale și organizatorice? Băiatul lui Dumitra și Vasile Simionescu era un copil frumos și normal de năzdrăvan. Din puținele mărturii adunate de la prieteni aflăm că la 7-8 ani, când se juca cu prietenii lui, el era „doctorul" (spune Cornelia Constantinescu, prietenă din copilărie) :

„Ne consulta păpuşile când erau bolnave şi îi permiteam să le facă injecţii cu acul de siguranţă. Era cel mai fericit când o auzea pe una tuşind. Avea spirt, vată şi vorbea cu ele asigurându-se că nu le doare…"

Merge la școală, unde este premiant cu coroniță în fiecare an, apoi la liceu, la fel. Un coleg de liceu, Paul Georgescu, azi profesor în Venezuela, isi aminteste:

„În prima clasă de liceu eu eram "chestorul" sau "monitorul" clasei, stăteam in banca întâi si prezentam "condica". Nu mă putea interesa un coleg cu "S"- coada catalogului, stătea în ultima bancă - şi, în plus, împărţea pupitrul cu… repetentul clasei. Mi-am schimbat curând aceste păreri, căci Simionescu era inteligent, ordonat, desena şi scria foarte frumos şi talentat la voley, basket, fotbal. Cânta in corul liceului, spunea poezii patriotice la serbări, la sfârşitul anului a luat după mine şi Dan Finţescu premiul trei. Noi ne străduiserăm mult, "care pe care", dar el nu făcuse vreun efort pentru a dobândi "acel detaliu", cum zicea el. Din clasa a doua, Nicolae Simionescu s-a maturizat si mai mult: era în toate echipele "de minge" ale clasei, recita din Eminescu la toate serbările, ca nimeni altul, se evidenţia la română şi latină şi, în continuare, nu-i prea păsa de matematică. De fapt, el decisese că se va face medic. In 1940 fuseserăm cu toţii "străjeri" şi unii băieţi chiar îşi exprimau simpatiile pentru un partid sau altul, dar astea pe amicul nostru nu l-au afectat în nici o formă. Citea mai mult ca noi şi, fiind mai liberal crescut de către părinţii săi, a început să meargă regulat, până şi noaptea, la teatru, la piese pentru "cei mari" şi la concerte. Nicuşor a "trecut" la italiană, pe când aproape toţi ceilalţi aleseserăm germana. A fructificat şansa de a-l avea profesor de italiană pe fiul lui Perpessicius, ce l-a prezentat marelui literat. Acesta i-a intuit "stofa" şi l-a stimulat şi el pentru a-şi dezvolta cultura".

"Tatăl său i-a fost un exemplu permanent şi l-a ajutat să-şi clădească meritata încredere în propriile forţe, fapt pe care savantul de mai târziu l-a recunoscut cu un amor filial inegalabil".

În facultate este fascinat de Prof. Gr. T. Popa; își petrece concediile citind și lucrând, fuge pe munte când poate, se reintoarce repede si apoi uită să mai plece din laborator. Perioada petrecută la Endocrinologie până la data plecării în "aventura americană" – a însemnat 300 lucrări publicate, multe în colaborare cu Prof. Milcu și cu mine. Monografia "Cancerul Tiroidian" publicată în Editura Academiei este cerută pentru publicare de către editurile Heineman din Londra și Academic Press din SUA. Simultan este și conferențiar la catedra de Anatomie.

Iată cum îl descrie Profesorul Ștefan Milcu:

"Tânărul Simionescu s-a impus printr-o impresionantă devoțiune în activitatea de investigare şi, surprinzător!, prin capacitățile organizatorice a unui laborator de specialitate. Am fost impresionat de modul deosebit în care își desfăşura activitatea. Ca un adevărat cercetător, "n-avea program". Rămânea în laborator până târziu în noapte. Vedea în microscop ce alții nu vedeau!"

Prof. Milcu s-a străduit să deschidă poarta cercetătorilor către lumea occidentală. El întocmea anual liste pentru plecări la congrese și specializări: primul pe listă era Nicolae Simionescu. Sistematic, anumite nume dispăreau de pe acele liste. Printre respinși figura, de fiecare dată, Nicolae Simionescu. "Dragă, i-a spus cu amărăciune Prof. Milcu, nu te vrea partidul, te-au scos de pe listă. Cică nu ai origine sănătoasă…" Aceste absurde refuzuri erau suportate cu stoicism de tânărul cercetător, spune Longin Popescu. Mai grav a fost faptul că an de an era pe lista celor disponibilizați de la Catedra de Anatomie a Facultații de Medicină. Era considerat un "element nedemn" pentru educația tinerilor. Nu avea origine sanatoasa. Din fericire, în fiecare an salvarea venea de la vestitul chirurg, Prof. Dorel Burghele, care era ministru și care anual punea rezoluția de neacceptare a concedierii sau "transferului", motivând "calitățile profesionale excepționale ale conferențiarului Simionescu".

În afară de profesiune, Nicolae Simionescu are un spațiu interior generos, plin de vise și de afecțiune pe care simte nevoia să o dăruiască. Și-a iubit enorm mama și și-a adorat tatăl, pentru care a avut un cult deosebit. Tatăl l-a dus pentru prima oară pe munte (la 5-6 ani) și a rămas toată viața cu o mare iubire pentru munte. A fost alpinist, schior iar visul lui era să ajungă în Himalaia. Are în bibliotecă tot ce s-a scris despre expedițiile în Himalaia, care îl fascinau… un vis neîmplinit.

Marea lui mândrie sunt băieții săi, Vlad și Dan. Le prevedea un viitor mare, era foarte exigent cu ei, dar o exigență plină de dragoste, tandră. Le lăsa toata libertatea de a se desfășura independent, dar îi veghea cu grijă din umbră. Crede profund în Vlad și Dan, nu încearcă să-i influențeze decât prin exemplul personal. În lungul timpului îi tratează totdeauna ca pe niște "băieți mari" care trebuie să-și ia singuri deciziile majore de viață. Și nu a greșit cu nimic...

Își adora mica lui nepoată, Adriana, libelula asa cum îi spunea. Iubea prietenii și prietenia; îi alegea cu mare grijă, dar odată aleși, le rămânea credincios toată viața. Își adula maeștrii. Iată ce spunea despre ei:

„Am avut deosebitul privilegiu de a lucra cu unii din cei mai remarcabili profesionişti şi oameni de ştiinţă care mi-au influenţat în mod hotărâtor întreaga mea activitate. Aceştia au fost: Prof. Gr. T. Popa (anatomie), Prof. Ion Juvara (chirurgie), Prof. Şt. M. Milcu (endocrinologie), cu care am lucrat împreună 18 ani şi Prof. George Palade (biologie celulară), lucrând împreună 10 ani la Universitatea Rockefeller şi la Universitatea Yale, SUA, urmaţi de 13 ani de colaborare, încă în curs. Rolul lor în formarea mea este inestimabil”.

Iubește copiii cu o tandrețe specială – între cele peste 15.000 de diapozitive din colecția lui, o bună parte, sunt figuri de copii din toată lumea. Iubește florile – florile de munte în general și, pe cele din Piatra Craiului, în special.

Cu aparența lui puțin austeră – era un model de grație și poezie interioară.

Cultura prodigioasă și memoria sa îi uluiau pe mulți: după 30-40 de ani de la terminarea școlii, recita versuri întregi în latină. Cunoaște toți fotbaliștii români, italieni sau francezi. Are o trăsătură romantică – ascunsă cu grijă - și un entuziasm fără limite, dar nu știe să se cruțe!

Deci, cine este Nicolae Simionescu?

Longin Popescu îl descrie cu har:

“Viaţa lui a fost de o intensitate puţin obişnuită, ca o flacără de magneziu. A fost un savant al inimii, dar niciodată al propriei sale inimi. Romantic prin destin, clasic prin rigoare şi caracter. Medic, chirurg, endocrinolog, biolog, profesor universitar, manager, academician. Aşa cum poetul, privind intens iarba, a devenit “doctor în iarbă”, Nicolae Simionescu, privind zeci de ani celulele corpului uman, a devenit doctor in biologia celulară. Prin crearea unui institut care să nu aibă alt scop decât să studieze celula inimii, a vaselor de sânge, acest savant “al subtilităţii extreme” a introdus, practic, înăuntrul cortinei de fier şi chiar dincolo de cortina ceauşistă de plumb, calul troian al gândirii libere”.

2. NICOLAE SIMIONESCU - CTITORUL

GENEZA ȘI DEZVOLTAREA INSTITUTULUI DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ

Ideea unui institut de biologie celulară în România a germinat în mintea Prof. Nicolae Simionescu imediat după sosirea lui in SUA. La doar 13 zile după ce a ajuns la Universitatea Rokefeller, Nicolae Simionescu notează în jurnalul său:

"Vineri, 13 Februarie 1970.

Cât de mult mi-au lipsit, şi mai ales la timpul respectiv, o atmosferă adevărată de viaţă ştiinţifică, de cercetare. Ce simplă e, ce firească şi de un singur fel; nu poate fi altfel, decât într-un sistem fals, artificial. O, dacă aş putea crea un astfel de crâmpei de viaţă adevărat, măcar pentru generaţia următoare de cercetători..."

Iată cum descrie Prof. Nicolae Simionescu (NS) crearea Institutului în interviul realizat de Dl. Nicolae Ţzone (NŢ) (interviul integral într-un capitol separat).

NŢ: ***Cum s-a născut ideea unui Institut de Biologie şi Patologie Celulară la Bucureşti?***

NS: „Naşterea acestuia a avut la bază un proces mai lung, în preajma căruia am putea glosa îndeajuns. Vedeţi dv., că vrei să te întorci sau nu vrei să te întorci în ţara ta de origine, că vrei să faci ceva acolo sau nu vrei, eu am considerat şi consider că este ceva foarte personal. Nu găsesc că am făcut ceva nemaipomenit prin faptul că ne-am întors în România. N-am făcut niciodată caz toţi anii trecuţi în privinţa aceasta, deşi, cum puteţi bănui, facilităţile şi propunerile de posturi de Chairman şi Profesor pe care le-am avut în America le depăşeau de nu ştiu câte ori pe cele ce urma să le primim în România. Dar, încă de la bun început, ideea noastră de bază a fost pur şi simplu să ne formăm acolo şi, cu ce învăţăm acolo, să ne întoarcem în ţară şi să facem un centru de cercetare.

Sentimentul acesta al instituţiei a fost foarte puternic la noi şi e foarte puternic şi acuma. Credem, şi eu şi Maya, în puterea instituţiilor. Trebuie să faci o casă, trebuie să ai o grădină în care să pui un pom. Trebuie să ai o casă, pe care să o înzestrezi cu tot ce este necesar pentru a putea, în felul acesta, să creşti nişte oameni în jurul tău. Nişte oameni deosebiţi. Să faci, ceea ce se spune, în termeni mai pedanţi, o şcoală. O şcoală pe care să o ridici la rangul de instituţie. Si cum în anii în care noi am început activitatea în America, virtual biologia celulară nu exista în România, gândul de a fi întemeietorii acesteia aici l-am avut în permanenţă. Profesorul Palade ne-a spus: "Mai staţi un an de zile. Unde să vă întoarceţi acolo?" El era foarte realist: "N-aveţi unde să lucraţi. Nu vă mai puteţi întoarce". Avea dreptate, pentru că la Bucureşti şedeam propriu zis într-un laborator în care exista un singur microscop cu lumină. Deşi lucram şi dormeam în laborator săptămâni după săptămâni, totuşi absenţa aparaturii era esenţială. De fapt, Palade ne-a şi explicat, la un moment dat, de ce ne-a invitat pe noi, la prima sa vizită în ţară, dintre toţi cei cu care a interacţionat: "Mi-aţi făcut impresia că sunteţi nişte sisifi amândoi şi mi s-a părut că-i păcat de voi să nu vi se creeze nişte condiţii de lucru rezonabile…"

Pentru mine probabil că era la mijloc şi un anumit sentiment care ţinea de biografia personală, legat în special, de frustraţiile pe care le-am îndurat în tinereţe. Pentru că am fost un chinuit în tinereţile mele, din punct de vedere a ceea ce am vrut să fac şi a modului dureros în care am fost marginalizat în permanenţă. Nu vreau să mă lamentez, şi nu vreau să discut despre greutăţile, inechităţile crase de atunci, dar nu pot să uit că mi s-au mâncat foarte preţioşi ani din viaţă. Astfel, că la un moment dat, în 1972, într-o suită de împrejurări care sunt foarte amuzante, m-am aşezat împreună cu Maya în faţa unei hârtii de împachetat şi am spus şi unul şi altul în acelaşi timp: "Hai să facem un Centru modern de biologie celulară, să adunăm nişte tineri în jurul nostru, sa-i formăm, ca un fel de familie şi să asigurăm, astfel, o oază de muncă, şi de linişte, şi de seriozitate."

Mai departe Prof. Nicolae Simionescu spune:

„Am făcut, Maya şi cu mine - şi acele schiţe iniţiale ne-au fost de mare folos - un plan detailat şi am selectat din tot ce văzusem la Rockefeller, în occident, cele mai viabile soluţii. Aşadar, pe scurt, din '73 până în '79 am revenit în ţară în fiecare an şi practic, am petrecut vacanţele noastre lucrând cu constructorii, cu arhitecţii, cu instalatorii. În '77 a fost şi cutremurul deosebit de violent, care a întârziat şi el lucările. Câteodată am stat în ţară o lună, altă dată 2 luni de zile. Profesorul Palade a fost foarte înţelegător, deşi ne spunea că suntem "patrioţi superstiţioşi", iar unii americani nu înţelegeau de ce ne trebuiau nouă asemenea complicaţii. Mulţi însă ne admirau pentru ceea ce încercam să facem.

După o perioadă intensă din toate punctele de vedere, la 3 septembrie 1979 Institutul a fost deschis oficial printr-un Simpozion inaugural de prestigiu." Printre invitaţi se numărau Profesorii George Emil Palade, Christian de Duve şi Gunter Blobel, toţi laureaţi ai Premiului Nobel.

Clipele de sărbătoare adevărată n-au ţinut însă prea mult pentru că ministerul ne-a adus la cunoştinţă că nu mai poate să ne asigure nici un fel de fonduri. Înţelegeţi, după ce am făcut tot ceea ce am făcut pentru înfiinţarea institutului, ni s-a spus: "Regretăm, dar din momentul acesta sunteţi fără nici un ban". Şi atunci soluţia a fost una singură: să apelăm la nişte subvenţii din afară. Am intrat, astfel, în sistemul de competiţie al Institutului Naţional de Sănătate din S.U.A., singura Institutie care la acel timp oferea grant-uri in afara ţării (The US National Institutes of Health, prescurtat NIH). Şi, spre şansa noastră, înregistrând scoruri suficient de bune, am primit timp de 12 ani subvenţiile solicitate în SUA. Am fost singurul institut din Estul Europei care a obţinut asfel de grant-uri din SUA şi unul din cele 7 granturi acordate în afara Statelor Unite (în afară de Argentina, Israel, Elveţia etc).

Pe lângă fondurile pe care le-am primit prin grant-urile amintite, obtinute de la NIH, fonduri care s-au ridicat în total la peste 400.000 dolari, din 1979 şi până în anul acesta, noi ne-am făcut un obicei - nu foarte confortabil, nu foarte simplu - din a aduna materiale pentru institut. În acest mod, colectam de la prietenii noştri, de la colegi, de la cunoscuți, chimicale, cărți, reviste, chiar unele piese de echipament şi aparate costisitoare. Le împachetam, le încărcam într-un camion la Univ. Yale (la 120 Km de New York) şi le duceam la aeroport. În medie am transportat o tonă de materiale şi echipament în fiecare an. Cu totul am adus in Institut până acum 14 tone. În acei ani, o doamnă ("tovarăşă") ministru a învățământului ne-a trimis în institut o comisie de anchetă aflând că ne-a venit de la aeroport un transport din coletele pregătite de noi în S.U.A pentru ca să afle ce şi de ce transportam materiale pentru Institut din SUA? Greu să priceapă de ce o facem!

La ideea Profesorului Palade, s-a stabilit o convenție formală între Ministerul Invățământului din România şi cel din SUA (în 1979) de a rămâne "visiting professors" la Yale. Ideea Prof. G. Palade a mers binişor 4-5 ani. Apoi a fost din ce în ce mai greu să plecăm din țară iar în 1989 am obținut aprobarea cu foarte mari dificultăți."

Profesorul Palade întrebat, la un moment dat, dacă a fost urmărit de Securitate, a spus:

"Am fost, probabil, urmărit de câte ori am venit să-mi văd surorile, să-i întâlnesc pe profesorii Nicolae şi Maya Simionescu, să particip la diferite simpozioane. Câtă vreme regimul nu-şi putea exercita în întregime influența asupra Institutului de Patologie şi Biologie Celulară (Institut care beneficia şi de o importantă finanțare americană), era firesc să fiu urmărit, deoarece eu veneam la întâlniri de lucru cu cercetătorii români. Ori, I.B.P.C. era, în mintea dictatorilor, o agentură de spionaj a CIA" (Curierul Românesc, iunie, 1992).

La Prima Sesiune Ştiințifică a IBPC, în 1980, Prof. Nicolae Simionescu spunea:

„În viitorul apropiat, ştim înspre ce ne îndreptăm, dar nu ştim ce vom găsi… Am elaborat planuri, dar nu şi predicții, pentru că, în realitate, dacă lucrurile ce vor fi găsite vor fi într-adevăr noi, ele sunt prin definiție necunoscute azi. Suntem tonifiați de fiecare observatie nouă şi, în acelaşi timp fericiți că suntem atât de ignoranți încât să facem din fiecare zi, când reintrăm în laborator, o confruntare cu propriul nostru intelect."

În descrierile sobre ale lui Nicolae Simionescu despre realizarea IBPC nu se dezvăluie greutățile enorme pe care le-am întâmpinat, lupta cu autoritățile, îndeosebi după 1979, eforturile şi reuşita în trimiterea a 14 tineri cercetători români în SUA pe

burse Fullbright pentru un an și apoi anual pe termene mai scurte sau mai lungi alți 15 – 18 cercetători, tot în SUA. Pentru fiecare trebuiau cam doi ani de lupte cu forțe oculte, circa 20 de semnături și tuturor li se găseau probleme (fie este prea tânăr, or neînsurat, or are rude în străinătate).

În 1984 Prof. Simionescu îl destituie (fără preaviz), în 24 de ore, pe șeful de Cadre al Institutului, pentru că făcea mizerii tinerilor noștri colaboratori; începând cu a doua zi, nu i-a mai dat voie să intre în Institut. Faptul nu a rămas fără urmări pentru noi, sunt sigură. Șeful de Cadre nu a mai intrat în Institut, dar l-a dat în judecată pentru că, dupa cum scrie: "măsura o consider abuzivă amintindu-mi de patronii capitaliști cu care nu putem avea țeluri comune, aflându-ne într-o permanentă contradicție antagonistă… ați încălcat legislația muncii socialiste… servesc cu devotament și profundă claritate cauza revoluției noastre socialiste."

Presiunile exercitate asupra noastră au fost din ce în ce mai consistente, mai dese. Organizat cu suport financiar de la NIH, la fiecare trei ani a avut loc un simpozion româno- american. După cel din 1989, am fost chemați imediat la minister și trași la răspundere:

"Trebuie să vă apărați, ni s-a spus, că aveți trei capete de acuzație. Primul că sunteți spioni, pentru că ați vândut secrete științifice românești americanilor. Al doilea, tot ce ați lucrat, toate temele pe care le-ați avut n-au fost niciodată aprobate de statul român și în al treilea rând că nu publicați decât în reviste străine."

Ni s-au cerut o serie de documente în apărarea noastră. În fine, o perioadă tristă! Am avut mare noroc cu schimbarea din 1989… Important rămâne că Institutul există și și-a căpătat un binemeritat prestigiu și în acest prestigiu se afla bucuros implicat chiar viața noastră și a întregii echipe de cercetători de aici.

3. NICOLAE SIMIONESCU – CREATORUL SOCIETĂȚII ROMÂNE DE BIOLOGIE CELULARĂ

Profesorului nu i-a fost îndeajuns crearea Institutului - deschis tuturor cercetătorilor din țară. El dorea o școală națională de biologie celulară. De aceea, în 1981, începe să gândească o Societate Națională de Biologie Celulară. O perioadă grea – nu se mai făceau Societăți. El reușește. În viziunea lui aceasta ***"trebuia să fie o societate interdisciplinară şi multidisciplinară – să fie prima de această complexitate şi unitate"***. Reușește!

În iulie 1982, are loc Ședința de înființare a Societății Naționale de Biologie Celulară (SNBC), la București. Cu acest prilej, Profesorul ne spunea:

„Nu e nevoie de "încă o Societate" ci, de una care să vrea şi să poată efectiv reprezenta un mijloc eficace de a ajuta dezvoltarea la parametrii deceniilor moderne a cercetării biomedicale, a învățământului biologic şi medical. SNBC să fie o Societate a unor oameni curajoşi, demni şi neabătuți în dorința de a face ceva bun pentru țara noastră.

De ce facem o nouă societate? (1) Ca să ne aducem aminte de minunații cărturari şi oameni de ştiință ai țării noastre care, în vremuri grele, au ştiut să găsească resursele spirituale şi fizice pentru a crea asociații şi societăți ştiințifice şi culturale ce au modulat hotărâtor istoria social-politică şi culturală a țării; şi (2) Să înțelegem obligația ce ne revine de a lăsa generațiilor viitoare un început de drum".

Societatea şi-a creat imediat 7 filiale în marile centre universitare din țară. Astăzi are 13 filiale. Sesiunile anuale au devenit în timp mai fructuoase pe plan ştiințific, au creat colaborări între centre şi au stabilit trainice legături profesionale şi umane.

Profesorul folosea fiecare sesiune anuală a SNBC pentru a ne împărtăşi gândurile sale profunde şi curajoase, a ne da speranță (în vremurile acelea nemiloase), a ne menține entuziasmul. Iată doar câteva exemple din cuvintele lui: Atenție! Suntem înainte de 1989!

În 1985, la Sesiunea SNBC de la Tg Mureş:

„Acum mai puțin de 200 de ani (1794), LAVOISIER a fost condamnat la moarte prin ghilotină de un judecător care i-a scris în actul de condamnare: "La Republique n'a pas besoin de savants". Existența şi activitatea SNBC arată nu numai că țara noastră are nevoie, dar şi că a şi produs oameni de ştiință capabili să contribuie în continuare la patrimoniul inestimabil al cunoaşterii. Asta nu înseamnă că nu mai există şi astăzi judecători deghizați care neînțelegând nimic din măreția revoluției ştiințifice continuă să condamne ceea ce nu înțeleg. În condiții care nu sunt deloc uşoare, Societatea noastră trebuie în continuare să pună la baza dezvoltării ei alături de ŞTIINȚĂ, SUFLET, PATRIOTISM. Astfel vom putea privi cu optimism spre anii ce vin, în care noile generații să facă să nu mai apară niciodată un alt judecător al lui LAVOISIER".

În 1986, la Sesiunea SNBC din Craiova:

„Să folosim şi această sesiune pentru o mai bună cunoaştere reciprocă,

mai adânc respect al muncii fiecăruia (în special a celor care o fac în condiții mai grele) şi ca un corolar să închegăm şi mai mult comunitatea noastră profesională, formată din oameni cărora le pasă, care n-au fost atinşi de ceea ce unii numesc "forma cea mai inferioară a libertății, anume NEPĂSAREA".

Sesiunea SNBC, Iași, 1987:

„Aflați aici în Iaşi, minunat lăcaş de cultură, în intimitatea minții şi sufletului nostru, să închinăm această sesiune nesecatei inteligențe româneşti… cea care a creat valorile care de-a lungul anilor, buni sau mai puțin buni, au asigurat regenerarea spirituală care a stat şi stă la baza permanenței acestui popor. Să privim cu optimism viitorul şi posibilitatea de a contribui semnificativ la progresul ştiințific".

Sesiunea SNBC, Constanța, iunie 1989:

„În epoca în care trăim, activitatea SNBC este o briză de cultură, un act de patriotism, dar patriotism înseamnă, în cazul nostru, ştiință mai multă şi mai bună. Nu sunt vremuri simple, dar sa avem un optimism activ. Şi să fim animați de sentimentul că prin această societate, împreună am făcut să încolțească o mică floare, asemenea Micului Prinț care îşi uda zilnic floricica pe care o sădise pe mica lui Planetă. Şi noi să îngrijim floarea noastră în năzuința că va deveni perenă şi nu numai să o îngrijim, ci şi s-o protejăm pentru că, aşa cum spunea anticul Dumneavoastră concetățean OVIDIU: "FELIX QUI, QUOD AMAT, DEFENDERE FORTITER AUDET" (Fericit cel ce cuteză să apere cu putere ceea ce iubeşte). Vă doresc cutezanță, putere şi mult succes".

După 1989, Societatea este la fel de tonică și activă iar Profesorul își continuă pledoariile pentru apararea cercetarii, a științei. Astfel, revenind la Tg. Mureș în 1994 în cadrul sesiunii anuale ne spune:

„Acum 9 ani, în 1985, la cea de-a III-a Sesiune Anuală a Societății Naționale de Biologie Celulară, ne-am adunat în acelaşi auditorium. Eram în plină perioadă de brutal anti-intelectualism pe care am avut curajul - şi nu fără urmări - de a-l demasca evocând soarta lui LAVOISIER care - exact acum 200 de ani (1794) - era condamnat la moarte prin ghilotină fiindu-i scris în actul de condamnare: "La Republique n'a pas besoin de savants!" În aceşti ultimi 9 ani, țara noastră a trecut prin zbuciume şi jertfe dintre care unele au dus şi la unele transformări în mai bine: - ca oameni de ştiință suntem liberi să ne ducem unde vrem, să spunem ce vrem, să colaborăm cu cine vrem. Şi totuşi aceste evidente câştiguri nu ne sunt de ajuns. Şi fără a însemna că ne lamentăm trebuie să spunem

pe nume condițiilor de viață foarte grele şi facilităților de lucru nesatisfăcătoare. Desigur nu mai trăim în vremuri ca acelea ale lui Lavoisier dar, din păcate, ştiința în România nu a ajuns la statutul pe care-l merită deoarece sunt unii care din incompetență ignoră ştiința şi pe cei care o slujesc. Mai mult, alții contestă rolul cercetării, şi îndeosebi a celei fundamentale în progresul socio-economic, în felul acesta condamnând ceea ce nu înțeleg. De aceea, în aceste vremuri, comunitatea ştiințifică trebuie să iasă din pasivitate şi să-şi impună punctele de vedere pentru a schimba mentalitatea organelor de decizie. Democrația nu înseamnă populism şi politicianism declarativ. Democrația implică competență, responsabilitate şi intelocrație".

4. NICOLAE SIMIONESCU - CERCETĂTORUL - PROFESORUL

Cercetătorul. Nicolae Simionescu privea cu cucernicie cercetarea ştiințifică. O socotea, după cum scria în 1984:

„Efortul intelectual cel mai creator de care omul este capabil. In istoria omenirii, nevoia de cunoaştere a apărut ca o trăsătură definitorie a ființei umane. În lupta cu natura, omul a trebuit să caute sau să creeze mijloace de adaptare, apărare sau atac. Astfel, cunoasterea din curiozitate a fost ulterior arbitrar definită "cercetare fundamentală", iar cunoasterea generată de nevoia de soluții a fost, într-un sens foarte larg, numită cercetare aplicativă. Această taxonomie este larg criticabilă, iar folosirea acestor termeni operaționali în politica ştiinței a creat şi creează încă dificultăți şi uneori erori în soluții."

„...Cercetarea fundamentală în biomedicină are prin obiectul ei - omul - cea mai aplicativă dintre cercetări deoarece se adresează omului ca fiind nu numai pateticul nostru capital dar neîndoielnic unicul producător al oricărei alte cercetări."

Iată cum îl privește Prof. Milcu pe cercetătorul Nicolae Simionescu:

„În acest tânăr, care a apărut în fața mea, am simțit imediat patosul, acea forță interioară căreia nu-i rezistă nimic. Ce tensiune interioară, ce aspirație spre cunoaştere că în fond ştiința la asta ne aduce: la cunoaştere şi la o reflectare mai reală a tot ceea ce vedem căutând, dacă ai insomnie, explicația a tot ce ai văzut în ziua aceea. Şi el într-adevăr a demonstrat-o din plin. Nicolae Simionescu ştia că atunci când începe o cercetare dacă trebuie să stea noaptea, rămâne noaptea până termină şi i-am spun: "Vezi că acolo au trecut mulți şi nu au văzut, poate vezi tu." Şi într-adevăr, în cancerul glandei tiroide, în care trecuseră alții, el a reuşit să vadă cancerul medular. Acei ochi pătrunzători şi mintea care se ascundea îndărătul lor, cât au pătruns în ceea ce alții nu au văzut. A fost un descoperitor."

Dușmanul său cel mai aprig era timpul. În 1970 la Universitatea Rockefeller, scria în jurnalul său:

„Îmi place atât de mult ce fac şi cât învăț, încât simt o cronică lipsă de timp. Mă simt ca Pigafetta, (cronicarul şi biograful lui Magelan): caut drumul prin endoteliu (continentul american cu porțiunile lui turtite) spre spațiul extracapilar (Oceanul Pacific)..."

Ideile și descoperirile profesorului Nicolae Simionescu sunt ample, originale și preluate rapid de comunitatea științifică internațională. Colaborarea excelentă cu profesorul S. Milcu a îmbogățit substanțial literatura de specialitate în studiul glandelor endocrine, îndeosebi a tiroidei și suprarenalei. Cartea lui despre tiroidă i-a adus recunoaștere internațională și premiul Academiei Române. Noile date aduse în colaborare cu prof. George Palade și cu mine în studiul transportului macromoleculelor prin endoteliu au avut darul ca, în 10 ani, disputa dintre biologii celulari și fiziologi să se apropie de un punct de vedere comun. Descoperirile și ipotezele noastre asupra rolului veziculelor în transport au fost validate în decursul timpului prin tehnici moderne de biologie moleculară și azi, sunt total acceptate în literatura științifică. Termenul și conceptul de "transcitoza" și mecanismele sale au devenit atât de clasice, încât nici nu mai este citat autorul, Nicolae Simionescu. Nu cred că l-ar supăra.

Profesorul. Prin anii 1960, lucrând la Institul de Endocrinologie am fost de mai multe ori la cursurile de Anatomie ale Profesorului. Erau fenomenale. Studenții îl primeau cu aplauze, iar la sfârșitul cursului pleca tot în aplauzele studenților; el se simtea evident stânjenit. Interesant, după 20 de ani, la Universitatea Yale, alte cursuri, alți studenți, aceleași aplauze. Studenții l-au propus ca "Teacher of the Year" pentru Premiul Borum. Îi plăcea să predea, să explice, să comunice, să transmită. Avea vocație pentru catedră, după cum avea vocație pentru laborator: era răbdător, jovial și exigent. Una din maximele sale era:

"Accept pedeapsa exigenței
Detest iertarea indolenței".

David Castle, un fost student american al Profesorului spunea:

„Nicolae Simionescu a fost un maestru al predării prin metoda socratică şi a fost întotdeauna principalul meu model de urmat. Mă simțeam fericit, când ştiam că este mândru de mine".

5. NICOLAE SIMIONESCU – MEMBRU AL ACADEMIEI ROMÂNE (1990); VICE-PREȘEDINTE (1994-1995)

Prof. George E. Palade a sesizat cel mai bine rolul pe care Nicolae Simionescu și-l asuma în Academia Română. El spune:

„Nicolae Simionescu a acceptat aceste noi responsabilități cu sentimentul misiunii de a îmbunătăți condițiile şi nivelul de finanțare al cercetării în România. Ceea ce el a simțit că este valid şi are succes în țările vestice a încercat să le adapteze la nevoile comunității ştiințifice din țară".

În 1994, ales Vicepreşedinte al Academiei Române lansează un „Plan de acțiuni pentru îmbunătățirea cercetării ştiințifice în Academia Română" – un plan larg, sistemic şi temerar pentru reforma activității de cercetare în Institutele Academiei. In cadrul multiplelor acțiuni anvizajate, a inițiat primul sistem de Grant-uri competitive de cercetare în România. A fost primul pas făcut de Prof. Simionescu şi conducerea de atunci pentru un viitor mai bun al cercetării.

Iată ce spune Nicolae Simionescu în mai 1994 inaugurând în revista "Academica" rubrica inspirat intitulată "Quo Vadis Academia?":

„(1). Este notoriu că Ştiința contemporană avansează într-un ritm extrem de alert la care toate comunitățile ştiințifice fac un deosebit efort de a se racorda.

Chiar dacă cercetarea ştiințifică (CS) în Academia Română (AR) ar merge excelent, totuşi prin natura şi scopurile ei în permanentă adaptare, activitatea de cercetare se cere în continuare ameliorată. Din păcate însă, datorită unui complex de motive, cercetarea în Academia Română nu atinge decât în puține domenii performanțele la care o îndreptățeşte potențialul intelectual al acestei institutii. Îmbunătățirea CS reclamă unele reconsiderări în mentalitate, management, structură instituțională, mecanisme de finanțare etc.

(2) Dacă nu facem un efort să modernizăm şi să revitalizăm CS în Academia Română, fără voia noastră vom fi părtaşi la pericolul grav al perpetuării şi adâncirii decalajelor tehnologice şi de competitivitate ale României şi prin asta la pierderea identității patrimoniului intelectual românesc în cadrul comunității ştiințifice internaționale.

(3) Modernizarea condițiilor de lucru şi asigurarea nivelului de trai corespunzător misiunii sociale a omului de ştiință, este cel mai bun remediu al "brain-drain-ului" pentru prevenirea căruia, din păcate, nu se întreprinde nimic. De aceea, este esențială luarea urgentă de decizii politice care să ateste concret că,

chiar şi într-o perioadă de declin economic, sprijinirea cercetării fundamentale este o datorie morală a Statului. Investiția constantă în ştiințele de bază şi în formarea noii generații de scientişti este cea mai lucidă şi mai sigură investiție în viitor.

Pe firul continuității valoroaselor nostre tradiții, avem datoria morală să încercăm să asigurăm apariția spiralelor ascendente ilustrate de Salieri, dar şi de cât mai mulți Mozart.

În cadrul acestor măsuri, Academia Română va institui începând cu anul 1995 o finanțare competitivă a cercetării ştiințifice prin Grant-urile Academiei Române (GAR). Sistemul GAR introduce principiile stimulative ale liberei competiții în ştiință care a constituit şi reprezintă şi în prezent una dintre cheile remarcabilelor progrese ştiințifice şi tehnologice obținute în țările avansate; el va funcționa concomitent cu finanțarea pe programe şi proiecte în cadrul instituțional actual al Academiei Române."

Din păcate, timpul nu i-a dat răgazul să facă tot ceea ce și-ar fi dorit pentru cercetarea din Academia Română și din România.

Considera Academia locul unde trebuie să coexiste: maxima scientia et maxima moralia (Maya Simionescu și Nicolae Simionescu, Academica 2001).

Ideile Profesorului despre Academie au fost sintetizate de el în următoarele puncte:

„1. Academia este o parte şi o emanație a cercetării ştiințifice;

2. Academia are nevoie de un sistem de criterii obiective pentru evaluarea unei candidaturi;

3. Academia are nevoie să primească tineri scientişti;

4. Generația „calendaristică" vs. generația „ştiințifică". Aici se impune o precizare. Spiritul nou şi concepția modernă asupra cercetării şi organizării ei nu sunt un atribut exclusiv al generațiilor mai tinere. Prin pregătire, experiență, condiții de lucru, calități personale, potențial biologic şi performanța profesională, fiecare dintre noi poate fi definit şi prin doi parametri care reflectă apartenența la o anumită "generație": "biologică" sau "ştiințifică". Academia este o emanație şi o parte a cercetării ştiințifice

Generația „biologică" (calendaristică) se dovedeşte, în unele cazuri, a fi neesențială, cum este exemplul unor eminenți oameni de ştiință, ca Prof. Ştefan Milcu sau Prof. G. E. Palade (şi exemplele sunt numeroase). Beneficiari ai unei structuri biologice şi intelectuale de excepție, prin felul în care gândesc şi acționează ei au aparținut şi aparțin în continuare generației ştiințifice tinere, de avangardă. Cât de relativ este impactul generației biologice asupra performanțelor profesionale se poate vedea şi în strălucitele exemple din alte domenii, ca cele ale artei şi culturii (P. Picasso, P. Cassals, A. Rubinstein, A. Horowitz etc.)."

6. NICOLAE SIMIONESCU - ROMANTICUL GÂNDITOR

Poate aceasta este partea cea mai ferită de lume a profilului uman al lui Nicolae Simionescu. Iată câteva din gândurile sale pasionate și pasionante despre cercetarea științifică:

„Cercetarea ştiinţifică este mai mult decât o profesie, este un mod de a trăi, cu strădanii reuşite alături de încercări nereuşite, iar între ele marea agitată a îndoielilor care te invită la înţelepciune. Iar în lupta dintre bucuria succeselor şi amăreala eşecurilor, principalul instrument de conservare rămâne pasiunea."

„Nu se poate construi nimic durabil, dacă în materialul de construcţie nu este adăugat "quatum satis" - suflet. Fără dăruire nu poţi deveni niciodată ceea ce admiri".

„Cercetările de Biologie Celulară şi Moleculară din ţara noastră trebuie să se adreseze din ce în ce mai mult marilor probleme ale materiei vii… Ştiinţa mare este generată de întrebări mari şi de setea de răspunsuri la marile întrebări ale cunoaşterii, răspunsuri care odată obţinute vor genera noi întrebări şi mai profunde… Năzuinţa biologilor celulari spre adevărul ştiinţific este o izbândă a adevărului în general de care societatea noastră are atâta nevoie… Orice minte lucidă, poate înţelege că România intră mai repede în Europa şi Lumea civilizată în primul rând prin cultură şi ştiinţă şi mai puţin prin autoturisme Dacia sau Lăstun… De pe o astfel de poziţie, finanţarea corespunzătoare a Cercetării Fundamentale nu apare ca un lux ci ca cea mai potenţial productivă investiţie în inteligenţa românească. Cu atât mai mult cu cât avem în ţară laboratoare de Biologie Celulară care sunt de mult şi bine intrate în Europa şi în Lume… Nesusţinându-le riscăm să distrugem şi puţinele capete de pod construite atât de greu… Orice minte informată, ştie că nu se poate sconta pe un progres economic fără sprijinirea cercetării fundamentale…"

„Desigur, ignorarea cercetării, are ca efect negativ şi HOMORAGIA alarmantă la care asistăm: internă, spre alte profesii mai productive şi externă, care duce la un vid de valori şi absorbţia de demagogi şi nonvalori. Speranţa rămâne în cercetătorii tineri - infuzie de "fresh blood". În condiţiile lipsurilor actuale, ştiu că e greu să vorbeşti despre PATRIOTISM.. Şi totuşi…
Dacă Dăruire nu e, nimic nu e…"

În puținele ore de răgaz, sculpta în lemn, compunea muzică, și scria poezii. Dragostea pentru poezie, pentru cultura și pentru marile noastre valori culturale s-a tradus prin ideia Profesorului de a organiza în institutul nostru "Comemorarea lui

EMINESCU" – la 25 Iulie 1989, când cei 100 de ani trecuți de la dispariția marelui poet nu au fost aproape nicăieri amintiți în țară.

Iată secvențe din gândurile Profesorului exprimate la deschiderea Sesiunii de comemorare a lui Mihail Eminescu:

„A comemora (a ne aminti împreună) pe Eminescu nu este numai un act de pietate și un câștig în înțelegerea valorilor culturale care definesc poporul român, ci și un prilej să reînvățăm a stima și a iubi."

„....De la conceperea lui, institutul nostru a fost gândit ca o instituție de cultură în care se lucrează știință. Această concepție avea la bază două idei general acceptate. Prima: Știința este parte a culturii, iar a doua: Cultura înseamnă deopotrivă trei lucruri: creație, asimilare și transmitere de valori. În fond, acest mod de a concepe un Institut, pune, la o scară foarte restrânsă, problema generală a rolului culturii în formarea unui om de știință.

Istoria Științei arată că un cercetător poate ajunge la o exprimare deplină a personalității lui creatoare, atunci când este sensibilizat prin cultură. Pe plan individual este problema relației între creatorul de artă și receptorul (nu receptorul celular) om de știință. Orice receptor este un potențial creator, deoarece însăși asimilarea unei valori literare sau artistice poate conține componente ale unui act autonom de creație. Această fațetă a relației cultură-știință, dă un sens mai complex cunoscutului Homo Cogitans - Homo Significans.

„...De la început (în Institut, n.r.), noi cei doi "seniori", am avut sentimentul responsabilității de a le asigura aici nu numai aparate, chimicale și cărți, ci și condiții pentru o formare complexă, în care să se îmbine armonios un înalt profesionalism cu o largă și nesăturată deschidere spre mesajele perene ale culturii."

„...Și atunci, ca și acum, am fost profund convinși că, mai mult ca oricând, țara noastră are nevoie nu numai de buni tehnologi, ci și de creatori de știință sensibilizați și fertilizați prin cultură. Din astfel de oameni ies marii **patrioți**."

„...Ca biologi, am înțeles foarte bine că așa cum unele viețuitoare trăiesc în apă sau aer, omul trăiește în cultură, acel "ceva" dincolo de binele sau răul cotidian. Dar, tot ca biologi, ne-am dat seama că în lumea contemporană (deseori "o lume ca nelumea"), așa cum toate mediile naturale sunt poluate și cultura poate fi poluată. De aceea cred că este oportun să vorbim azi de o ecologie a culturii la care avem datoria de a participa activ pentru identificarea și combaterea surselor de poluare și a gravelor efecte pe care le pot avea asupra purității și viabilității moștenirii spirituale pe care o transmitem viitoarelor generații."

„....Pentru orice societate, inclusiv a noastră, progresul depinde de capacitatea de a forma "masa critică" de oameni demni, capabili şi fermi să orânduiască natural scara valorilor, împotriva poluantei non-valori".

„...Mihai Eminescu,... care, în numai 15 ani de creaţie, ne-a dăruit alături de o inegalabilă poezie, peste 14 000 de file de manuscris adunate în 44 de caiete. ...De ce sunt atât de importante pentru noi caietele lui Eminescu? Pentru că ele reflectă o imensă sete de cunoaştere pentru tot: filozofie, filologie, economie, istorie, etc. Şi, deşi Eminescu nu şi-a luat Doctoratul, caietele lui conţin zeci de pagini de adnotări de biologie, chimie, fizică, matematică. Comemorându-l pe Eminescu, reiterăm îndemnul, adresat îndeosebi tineretului nostru, pentru încredere în geniul creator al poporului român şi năzuinţa activă spre o formare complexă".

Cât de adevărată gândire... și curajoasă... repet, eram în 25 iulie 1989.

Profesorul compunea muzică, sculpta și scria poezii. Multe, frumoase și ținute ascuns de ochii lumii. Nu știu ce este firesc să fac cu ele... Acum, aici am să destăinui o poezie scrisă de el cu mulți ani în urmă, dar care azi, are o încărcătură emoțională specială:

„OGLINZI

„Eu însumi am crescut în mine.
Şi cel mai acru rău şi cel mai zdravăn bine
Nimeni nu mi le-a dat
în măsura în care le-am adunat.
Şi am să fug singur cu ele-n gol
în ziua în care am să uit să mă scol.

Privind lumea din colț
întind mîna spre mijloc, iar uneori
privind-o din mijloc implor
pentru încă-un mîine.

De fapt, oglinzi
pretutindeni oglinzi
aproape numai oglinzi.

New York, 29 mai 1970"

Duminică, 5 februarie 1995, în seara în care s-a culcat și "a uitat să se scoale", scria un articol despre "Rolurile Academiei Române"…..

NICOLAE SIMIONESCU EXISTĂ ŞI VA EXISTA ÎNTOTDEAUNA PRIN GÂNDIREA LUI

ACADEMICIAN
NICOLAE CAJAL
Preşedinte al Secţiei de Ştiinţe Medicale a Academiei Române
Preşedinte al Academiei de Ştiinţe Medicale

Este foarte dificil să evocăm în cateva cuvinte marea personalitate pe care a reprezentat-o, o reprezintă şi o va reprezenta în continuare pentru cultura românească, Nicolae Simionescu. Am avut privilegiul să-i cunosc evoluţia, să-l văd în curtea Facultăţii de Medicină când iesea în pauze de la anatomie, să-l văd în apropierea Prof. Gr. T. Popa, de care era foarte legat, să-l cunosc apoi mai bine la Institutul de Endocrinologie, pe care îl vizitam câteodată şi de câte ori eram la institut, urcam şi în laboratorul unde Nicolae Simionescu lucra de un timp împreună cu Maya Simionescu.

S-au amintit aici contribuţiile lui ştiinţifice, contribuţiile lui ca profesor şi creator de şcoală, ca întemeietor de institut. Voi încerca sa vă expun câte ceva despre colegul Nicolae Simionescu, la un moment dat chiar colaborator (după 1990) în cadrul Academiei Române, dar mai ales ca prieten. Trebuie să vă dau câteva exemple din care să vedeţi că ceea ce spun nu sunt aspecte conjuncturale. În general, Nicolae Simionescu a fost un om cu totul deosebit, un om cu o serie de calitati rare, cu o activitate pe care, nu orice om putea să o desfăşoare, cu o deosebită înţelegere şi o memorie cu totul neobişnuită. Am amintit aici calităţile lui de om şi de coleg.

Vreau să adaug la asta, evocând o anumită întâmplare, pe care poate nici Maya nu o cunoaşte. Îmi aduc aminte de momentul în care prof. Burghele şi Paul Niculescu Mizil încercau să găsească un loc pentru crearea, construirea unui nou institut sau poate, după ideile prof. Burghele, nu de a construi, ci de a plasa într-un alt institut, institutul lui Nicolae Simionescu. Am avut initial spaima şi apoi - graţie lui Nicolae Simionescu - bucuria de a-mi da la o parte aceasta spaimă, pentru că se insista foarte mult pe ideea de a se lua clădirea Institutului de Virusologie si de a se realiza acolo ceea ce trebuia sa fie opera lui Nicolae şi Maya Simionescu, Institutul de Biologie Celulară. De aici, reiese ideea pe care o susţineam mai sus, caracterul său de prieten, coleg şi

om: refuzul total a lui Nicolae Simionescu de a se realiza această idee năstrușnică, de a plasa noul său institut în clădirea Institutului de Virusologie. Mai mult, Nicolae Simionescu a fost un om care a apărat Institutul de Virusologie și ideea de a nu se strica munca altora. Am avut ocazia să discut foarte des cu el, mai ales după alegerea lui la Academia Română, unde am avut chiar bucuria sa fiu printre cei care au propus alegerea lui ca membru corespondent. Prof. Drăgănescu, pe atunci Președinte al Academiei, a ținut foarte mult la personalitățile lui Nicolae și Maya Simionescu, fiind susținut și de ceilalți colegi, care știau și recunoașteau valoarea deosebită a soților Simionescu.

Academicianul Simionescu s-a luptat pentru tenacitate și seriozitate în cercetare; spunea in permanență că este speriat adesea de ideea incompetenței și că trebuie făcut totul pentru ca in cercetare, amatorismul să fie înlocuit de seriozitate și competență. Într-adevăr, el a fost nu numai un susținător al acestor idei, dar și un luptător pentru ele. Am participat cu el, împreună cu Academicianul Ștefan Milcu, Prof. Mihai Zamfirescu și alti colegi la elaborarea Statutului Academiei de Medicină pe care el dorea a-l face un statut viabil și să transforme Academia de Medicina dintr-un for, oarecum sindical, într-o societate științifică reală. Seriozitatea cu care în întalnirile noastre din fiecare după-amiază, Nicolae Simionescu se lupta pentru fiecare cuvant din statut și fiecare noțiune este absolut remarcabilă. Nu accepta nici un fel de superficialitate, nici măcar într-o virgulă sau nici măcar într-un adjectiv pus nepotrivit. Era absolut deosebit, lucru pe care l-au confirmat și relatările unui coleg al meu din institut, Radu Iftimovici, care a scris o carte după o serie de interviuri despre Palade. El îmi povestea impresiile Prof. Palade despre Nicolae Simionescu. Acestea coincid în totalitate cu ceea ce a spus Maya și cu ce știm noi, și toate se bazau pe aceeași temă, credința în puterea stiinței și necesitatea dezvoltării și sprijinirii științei. Avea credința că, așa cum pe vremuri, se spunea despre o catedrală că era imaginea unui regim, a unei țări, a unui teritoriu, cercetarea științifică, institutele de cercetare sunt cele care au misiunea și menirea în acest moment, să aducă stălucirea țării noastre.

Dupa alegerea la Academie, Nicolae Simionescu a fost personalitatea care a sprijinit această institutie prin poziții oficiale sau mai puțin oficiale. Eram vicepreședinte in acea perioadă și m-am sfătuit foarte mult cu el. Trebuie să vă spun că era încăpățânat în dorința de a sustine un lucru bun, important și avea dreptate întotdeauna. A fost o personalitate care într-adevăr a sprijinit Academia Română, a sprijinit Academia de Medicină și a dorit ca aceste instituții să fie la nivelul la care le gândea și el; și le gândea și după ce văzuse și după propria lui imaginație, în condițiile în care el credea total în știință. Este de remarcat lupta lui pentru crearea Comisiei de Biotehnologie, la care am lucrat împreună. Am vazut în permanență gandirea lui; începuturile lui "Quo Vadis Academia", erau cu adevărat credințele lui și cred că ar fi fost și trebuie să fie în continuare gândite și preluate, pentru că reprezintă momente cruciale în evoluția cercetării științifice în țara românească.

Știu eforturile pe care le-a facut împreună cu Maya pentru crearea acestui institut, care astazi a ajuns un institut de mândrie pentru Romania, institut european de excelență. Eforturile lor gândite și pregătite, cum spunea domnia sa, pe o coala de hârtie, planurile centrului de biologie celulară, trebuie să știți că ele erau susținute permanent de Nicolae Simionescu la toate întâlnirile la nivelul ministerului Învățământului, la Consiliul Național pentru Știință și Tehnologie, apoi în Academia Română și Academia de Medicină.

Alegerea lui și a Mayei Simionescu ca membri corespondenți ai Academiei Române, apoi ca membri titulari nu sunt conjucturale, au fost absolut necesare, au fost o necesitate pentru evolutia cercetării în țara noastră, pentru evoluția gândirii în biologia celulară și nu numai. Pentru că, eu consider că activitatea lui, lupta lui pentru nou, erau necesare în relația dintre cercetare fundamentală și cercetarea aplicativă. Există două cercetări sau există numai o cercetare în care se aduce lucrul nou; toate acestea sunt de retinut, sunt memorabile pentru noi toți. Și cei care am avut norocul să trăim pe lângă el, să-i cunoaștem activitatea lui si a altora din grupul lui sunt benefice nu numai pentru memoria față de activitatea lor dar si pentru activitatea noastră și a colegilor noștri în general.

Cred că nu trebuie să vorbim de Nicolae Simionescu la trecut, trebuie să vorbim de Nicolae Simionescu care există prin gândirea lui și va exista în continuare prin tot ce a făcut pentru crearea școlii de biologie celulară și știința românească.

ÎNTÂLNIREA MEA CU PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU

ACADEMICIAN CONSTANTIN POPA
Director al Institutului de Boli Cerebrovasculare „Prof. Vlad Voiculescu"

Prima mea întâlnire cu Profesorul Nicolae Simionescu a avut loc în perioada studenției mele, întâlnindu-l ulterior în nenumărate alte situații. Am să-mi permit să evoc acum, câteva din aceste întâlniri. În ansamblul cunoașterii acestei mari personalități umane, aceste evocări ar putea să fie neobișnuite pentru o parte din colegii care au fost în aceeași perioadă cu mine, studenții Facultății de Medicină Generală din Universitatea "Carol Davila", fostul Institut de Medicină și Farmacie din București.

Înainte de toate, aș vrea să spun că, încă nu este momentul să se facă o evaluare a profesorului N.Simionescu; este însă momentul în care să ne aducem aminte, în fiecare an despre acest mare om de știinta și mare dascăl. De o mare complexitate umană, așa cum a definit-o atât de bine d-na Acad. Maya Simionescu¸ personalitatea Profesorului, nu cred că este posibil să fie încadrată cu exactitate, el depășind de departe tiparele vremii sale... Și mai cred că întâlnirile anuale, în care vedem ce-am făcut și cum ne plasăm vis-a-vis de cel care ne privește acum de la distanță, în orice domeniu al cunoașterii științifice, sunt necesare și utile atât pentru cei aflați la o anumită vârstă, cât și, mai ales, pentru cei tineri.

Eu consider că istoricește mai este timp să așteptăm și pentru faptul că Prof. Nicolae Simionescu ne demonstrează o continuitate. Este vorba astăzi de o continuitate și nicidecum o întrerupere. Prof. Nicolae Simionescu nu a dispărut. Uitați-vă în reviste! Dar pe de altă parte, dacă ne uităm la evoluția sa în timp, eu cred că cercetarea științifică universală și-a permis un mare lux și anume acela de a folosi un om pentru cunoașterea umană, un om care a parcurs pe riscul său personal de efort, de imaginație, de inteligența, dar mai ales riscul de sănătate, niște etape absolut surprinzătoare de la morfolog - anatomist riguros, la anatomo-patolog, la explorationist, la genetician ș.a.m.d. până la cercetarea ultrastructurală într-o variantă unică.

Aș zice un parcurs ideal; ce este mai potrivit pentru un om care a parcurs întreaga

biologie umană în structura sa macroscopică și microscopică, ani de zile, zeci de ani de zile, de la normal, cu Prof. Gr.T. Popa și ulterior singur și cu alți colaboratori? Ce este mai extraordinar să fi parcurs apoi morfo-patologia în variantele sale, cu predilecție în endocrinologie, pentru ca, în final, să realizeze o dezvoltare în aria mirifică ultrastructurală în care, îmi închipui, cu câtă dezinvoltură a pătruns, eliberat de "chinga" aceea, "coerciția" aceea pe care o dădea anatomia clasică pe care noi o învățam atunci de la alții, iar de la dânsul o învățam cu totul și cu totul altfel.

M-am uitat într-o carte excelent scrisă de prof. Costin Cernescu cu laureații premiului Nobel ai secolului al XX-lea. O carte interesantă. Am vrut să văd și eu dacă printre acești importanți laureați ai sec. XX, în spatele cărora, știm că au existat totdeauna un număr de oameni de știință care meritau în egală măsură să primească premiul Nobel, cu cine se poate compara prof. Simionescu? Am putut observa că nu se poate compara cu nimeni. Nu e nici o exagerare în aceasta afirmație. Este afirmația mea, că el este deasupra tuturor, prin modul în care s-a format, prin modul în care a fost dăruit biologic și prin modul în care a gândit cercetarea științifică, nu numai în România, ci în lumea întreagă. Încât, în această perspectivă, intervenția mea pare minoră deoarece se știe foarte bine pe mapamond, cine este prof. Nicolae Simionescu.

Și mă gândesc că ceea ce trebuie să reținem noi este spiritul în care el a lucrat, calitatea spiritului așa cum o concepea Goethe care spunea că "o calitate a spiritului este tocmai aceea de a stimula veșnic spiritul". El este unul dintre puținii oameni de la noi și din lume, care cred că se poate plasa aici. El nu ne va lăsa niciodată să fim liberi; nu ne va lasa niciodată să lucrăm independent, referindu-mă la rigoarea științifică, la calitatea umană și la responsabilitatea umană. Aflat, adesea, într-un loc sau altul de pe Terra (acest lucru nu cred că a avut prea mare importanță), Prof. Simionescu s-a simțit întotdeauna bine, pe teritoriul românesc.

Și acum, câteva din întâlnirile mele cu prof. Nae Simionescu (îmi permit să nu spun Nicolae Simionescu, pentru că acest nume a devenit atât de obișnuit, încât sensul lui nu este deloc peiorativ). Poate că și aceasta a făcut parte din elementele, care ne-au apropiat, până acolo încât, n-o să credeți, chiar și în perioada studenției, aproape că ne provoca să-i spunem așa, fiind evident că n-o puteam face…

Însă întâlnirea cu adevărat importantă cu prof. Simionescu s-a produs, pentru mine, în cercetarea științifică. Am urmărit de-a lungul timpului ce a făcut în domeniul vascular, domeniu de care mă ocup și eu. Eram așa de încântat de ceea ce observam în articolele apărute sub semnătura Prof. Nicolae Simionescu și Maya Simionescu. Era, dacă vreți, parte din noi și o parte din mine și, mă făcea să citesc articolul până la capăt, interesându-mă nu numai conținutul, ci și cel care-l scrisese, întrucât știam foarte bine despre cine este vorba.

Prima întâlnire cu prof. Simionescu a avut loc în perioada studenției (în anii 1958-1964), perioada în care prof. Simionescu era șef de lucrări la Anatomie; am avut șansa ca seria în care eram eu, să-l aibă responsabil de lucrări practice și, respectiv, de un curs de anatomie. O parte din cei de față își pot imagina această perioadă, altă parte nu și-o pot imagina, nefiind familiarizati cu atmosfera din acea vreme. După cele ce vă voi spune, veți observa că a fost pentru noi, tinerii studenți, necunoscători în multe, o perioadă relevantă din punct de vedere al condiției umane.

În primul rând, în sala de disecții, în timp ce noi lucram cu asistenții, era un permanent zumzet, erau 10 grupe care lucrau simultan. Noi lucram cu un valoros chirurg Dr. Oghină, care era mult mai în vârstă decât prof. Simionescu. În momentul când intra în sală prof. Simionescu, toată lumea înceta să mai vorbească, era o liniște totală; parcă-l văd și acuma, înalt, brunet, cu halat alb, șorț alb în față, căci așa se purta atunci. Un bărbat frumos! Îl apreciam, în egală măsură, cu toții, pentru că impunea prestanță, dar nu în sensul în care s-ar putea presupune - în relația profesor-student - ci în sensul distanței față de un om, la care, credeam noi, că niciodată nu vom putea să accedem, nici măcar cu un cuvânt. A trecut pe la fiecare grupă. A venit și la grupa noastră. Dr. Oghină s-a ridicat în picioare și l-a întrebat ceva. Noi disecam un trunchi cerebral. „Spuneți-mi și mie ce observăm dacă facem secțiunea aceasta oblică?" Avea obiceiul, ca în grupele bune, să nu ne întrebe de secțiuni frontale, sagitale și orizontale, ci de secțiuni oblice - mult mai complicate, ca să ne surprindă dacă știm bine anatomie topografică. Ei bine, am ezitat toți. Am dat eu un răspuns; mi-a răspuns cu un zâmbet care însemna că e bine. Dr.Oghină mi-a spus că a fost foarte bine.

Dr. Oghină ne povestea că era, după părerea lui, cel mai important anatomist pe care l-a cunoscut de la Prof. Rainer și Gr.T. Popa. Cursurile pe care le-am audiat au fost fascinante. El venea la cursuri fără hârtii, fără notițe și rareori folosea niște planșe. Se excela pe vremea aceea prin planșe. Avea niște cursuri de o claritate de cristal. Era o transmitere de noțiuni care nu aduceau nici un cuvânt în plus.

Dar, ceea ce ne impresiona pe noi, era plasticitatea exprimării și mai ales plasticitatea exprimării în grafică, în desen, a ceea ce voia să spună despre niște structuri foarte complicate. El o făcea în 2-3 scheme, toate într-un concept bine cunoscut al morfologiei funcționale așa cum o concepea Prof. Rainer și căruia, din acest punct de vedere și din altele, i-a fost în continuare credincios. Morfologia și anatomia este știința formei vii. El explica totul fără emfază, cu distanțare, cu o siguranță, cu o precizie și cu o convingere, față de care, noi nu aveam replică evident, dar mai erau și alții care puteau să aibă eventual o replică (mai erau desigur și alți profesori în Facultatea de Medicină). Acest element făcea ca la sfârșitul cursului noi să fim entuziaști, într-adevăr, uneori aplaudam, alteori nu, pentru că, adesea, după terminarea cursului, noi ieșeam afară în pauză și ne apropiam de dânsul și stătea de vorbă cu noi ori de câte ori era posibil.

Cursul pe care-l preda nu se observa că era pregătit dinainte. Bineînțeles că era pregătit, dar noi nu vedeam acea pregătire. Venea parcă la o discuție între colegi. De altfel distanța dintre catedră și noi, deși ni se părea așa de mare, din punctul nostru de vedere, el cred că nu o vedea, el era printre noi, încerca să ne transmită toate convingerile sale. Calitatea aceasta a cursului era extraordinară.

Tot în această perioadă din facultate am participat, fără să vreau, la un eveniment trist și semnificativ în același timp, din viața prof. Simionescu. Eram în biroul organizației de tineret (responsabil profesional), ceilalți erau membri de partid, eu nu eram încă. Am fost chemați la partid într-o zi, ni s-a pus un text în față, de către secretarul nostru de organizație, Savelciuc, spunându-ne că trebuie să semnăm acest material pentru că așa a zis tovarășul secretar de partid. Tovarășul secretar de partid era tot anatomist, unul din concurenții Prof. N. Simionescu la postul de conferențiar. Nu-i dau numele, el are un nume, dar de fapt este fără nume, chiar dacă acum se află în Germania… Acest text trebuia să-l semnăm și noi studenții, ca un argument de susținere a secretarului de partid, împotriva prof. Simionescu.

Ceilalți din birou au semnat în mod automat, eram niște copii, vă puteți imagina. Să nu credeți că eu am fost mai isteț, dar ceva mi se părea că este în neregulă. Cer permisiunea să citesc materialul înainte de a-l semna, evident că voiam și eu să-l semnez, nu puteam să ies din "front". Când am citit textul, pot să spun că m-am îngrozit , erau nedreptăți crase, din care rezulta, că prof. Simionescu este "cosmopolit". Cei mai tineri de astăzi nu-și pot da seama ce rezonanță avea termenul acesta în anii aceia. Însemna a fi vândut occidentului. Și argumentele pentru aceasta erau în principal două. Două erau lucrurile acuzatoare: unul mai puțin important, că vine la cursuri cu pantalonii strâmți (era o modă atunci și dânsul, așa era, venea impecabil îmbrăcat, cu o ținută superbă și asta impunea de la început), iar a doua observație, care îl încadra pe dânsul, în ceea ce se chema "opoziție", că în toate cursurile pe care le prezenta în fața noastră se menționau numai autori occidentali. Lucru absolut inexact. Eu observasem ceva, dar nu mi-am dat seama până atunci. Prezenta cursul din ziua respectivă, dar întotdeauna pe tablă, în dreapta punea autorii occidentali, iar în stânga scria conștiincios, autori sovietici. O dată, mi-aduc aminte, cred că nu greșesc, l-a scris chiar cu litere chirilice pe unul dintre ei. De ce a făcut-o așa, nu știu. Faptul acesta l-am mai verificat controlând cursurile mele ulterior, era un fapt real, deci dădea totdeauna și autori ruși și autori occidentali, aproape la fiecare curs.

Mărturisesc că l-am bănuit că o face cu ostentație (să nu mă credeți că eram un vizionar), era prea evident că în dreapta erau unii și în stânga erau ceilalți... Dar acum, când am văzut acest material, m-a revoltat chestia aceasta, și i-am spus secretarului de partid, că nu este adevărat, "vă arăt cursurile mele". „Dacă dumneata nu vrei să semnezi, nu semna și poți să pleci". Nu vreau să vă mai rețin atenția și să mai spun ce a urmat după aceasta pentru mine. N-am semnat și chiar după aceea, concursul

a avut loc, nu știu exact cum s-a desfășurat. Secretarul de partid a ajuns undeva pe la stomatologie, conferențiar, fapt este că la examenul pe care l-a dat seria noastră, a fost o tensiune extraordinară, din cei 7 care eram în birou, 5 au „picat", cum se spune (examenul se dădea cu prof. Riga, prof. Repciug și cu dânsul proba practică, erau probe de dimineață până seara). Unul a luat 5, iar eu nu știu cum s-a întâmplat, eram mai la urmă, am leșinat, pur și simplu. Și m-am trezit în fața dânsului. "Ce-i cu tine, Popa? Ce s-a întâmplat? Ai scris ceva acolo?" A citit cu atenție 2 minute, cred că nu mai mult, și după aceea mi-a dat drumul și mi-a spus să mă odihnesc. Mi-a dat nota 10. Nici acum nu știu dacă această notă de 10 mi-a dat-o pentru ca leșinasem, sau mi-a dat această notă pentru că probabil auzise ceea ce făcusem eu, într-o notă discordantă (fară a mă lăuda pentru că nu eram conștient de ce fac la momentul acela; eram totuși singurul din acel birou care am îndrăznit să nu semnez un document care era împotriva lui pentru niște lucruri neadevărate). După ce s-a întors din America, i-am povestit acest episod, s-a amuzat putin, "cred că l-am și uitat", mi-a zis dânsul.

O altă întâlnire din vremea aceea, a avut loc pe bulevard. Eram pe la Casa Armatei. M-a invitat să bem un suc (pe vremea aceea se servea suc cu sifon pe bulevard) și de acolo pâna la facultate am parcurs drumul împreună. Așa de fascinantă a fost discuția cu dânsul, aveam senzația că discutam cu un frate mai mare, care are grijă de mine și care se preocupa de mine fară să fie neapărat deasupra mea sau înaintea mea în demersurile sale. La facultate mi-a spus un singur lucru: "Ai grijă, tu te comporți cam riscant…". Poate era o aluzie la ceea ce se întâmplase anterior.

După ce s-a întors din America, m-a rugat să-l văd (eu ocupându-mă de neurologie) pe Prof. Tașcă, un cunoscut al lui, apropiat al lui, care a făcut un accident vascular. Și l-am vizitat. După ce am discutat împreună, într-o fracțiune de secundă, amândoi am ajuns în același loc, la aceeași concluzie. Și la sfârșit, în birou la mine, i-am spus părerea mea și mi-a spus că înțelege, știe ce va urma. Și într-adevăr așa a fost, cum a presupus dânsul. Este mare diferență spunea, între ceea ce putem obține pe animale și ceea ce se întamplă la om. Totuși pentru o parte din procesele care se întâmplă la om, studiul experimental pe animale, o dată și o dată va putea să rezolve și aceste probleme. Era vorba de o ocluzie de carotidă, era vorba de procesul de aterogeneză, de toată discuția cu privire la endoteliu ș.a.m.d. pe care am purtat-o o oră și ceva la mine în cabinet. Într-un colț aveam o carte a dânsului de anatomie. "Ce mai ziceți, domnule Profesor de cartea aceasta"? "Ei, asta nu mă mai interesează acum", era o carte de anatomie pentru disecție.

Încă un moment, care spune câte ceva despre această imensă personalitate umană a prof. N. Simionescu. Făceam atunci un fel de învățământ "teribil" de partid, pentru cei care erau cadre de conducere. Cum bine știți mai toți de aici, veneau pentru această formă de învățământ, o categorie de oameni cu pregătire superioară: filozofi, unii membrii ai Academiei. Dânsul participa ca director de institut, eu eram tânăr prorector

ştiinţific pentru o perioadă scurtă de timp. Eu am intrat în discuţie cu freudismul şi neofreudismul şi cu asta am încurcat lucrurile pentru că doar un singur profesor din sală ştia câte ceva despre asta, ceilalţi habar nu aveau. Dânsul venise cu diapozitive şi a cerut permisiunea să-şi expună punctul de vedere. Toată prezentarea dânsului se referea la Institut, la ce s-a realizat în Ţara Românească şi mai ales la lucrările făcute cu Palade, într-o prezentare pe înţelesul tuturor acelora care nu aveau de-a face cu medicina. Niciodată nu l-am auzit vorbind într-un mod echivoc, într-un cadru în care, de multe ori, erai obligat să vorbeşti într-un anumit fel. Acesta era profesorul Nicolae Simionescu, cel care a reuşit să depăşească vremurile, a reuşit să se ridice deasupra existenţelor şi să facă ceea ce avea înlăuntrul lui de făcut, cu ambiţia, cu tenacitatea şi mai ales cu un creier extraordinar, pe care îl consider unic.

Rugându-mă să-i examinez nişte rude din familie, din Bucureşti, din zona Tei, am văzut atâta comprehensiune şi atâta camaraderie, aş putea spune, în mulţumirile sale pentru ceea ce am putut şi eu să fac la momentul respectiv. Nu s-a îndoit nici o clipă că ar mai fi nevoie de cineva care să-i vadă, deşi erau nişte probleme de mare dificultate; din partea rudelor am văzut un fel de sublimare sentimentală extraordinară, în adoraţie şi mulţumiri pentru că cel care de acolo de sus (aşa îl vedeau dânşii pe Prof. Simionescu, şi aşa îl vedeam şi eu), s-a gândit să le vină în ajutor. Toate aceste lucruri le facea cu o delicateţe, şi cu o apropiere încât devenea aproape dezarmantă orice intervenţie.

Am asistat împreună aici la o întâlnire cu profesorul Poenaru; impresionantă această întâlnire la care am participat cu foarte multă plăcere şi atunci credeam că acele momente nu se vor sfarşi niciodată. Încercând să contribuie la o destindere în timpul unei prezentări cu rigori ştiinţifice, la un moment dat, Prof. Poenaru trece rapid din limba română, în engleză, franceză, germană şi rusă, revenind apoi în limba română. Răspunzându-i colegial, parcă pentru a împrăştia un eventual ,,echivoc", Prof. Simionescu i-a răspuns în limba japoneză...

Nu credeam că vor veni evenimente care să facă să regretăm că asemenea lucruri nu mai sunt posibile. In acea prezentare, de care o parte va amintiţi, am văzut un fel de gingăşie spirituală implantată într-o sobrietate unică a profesorului Simionescu, unică zic, şi specială pentru că această sobrietate specială apropie totul de valoare şi depărtează (fără cuvinte) non-valoarea. Aşa era el, avea un tactism pentru cei care au valoare şi era limpede că cei care n-au valoare n-au ce căuta pe lângă dânsul - fără prea multe cuvinte.

Am fost în Bucureşti când s-a spus că profesorul Nicolae Simionescu a fugit în America şi era în Universitate o discuţie pe tema aceasta. Am fost martorul unor discuţii. Niciodată, chiar şi cei care nu aveau habar de medicina din Universitate, nu l-au contestat pe acest om ca valoare profesională. Desigur că au făcut comentarii că rămâne în America şi nu se mai întoarce. Au regretat foarte mulţi din colegii care l-au

cunoscut și mai ales cei de la Institutul Parhon și nu numai, iar noi studenții, care nu mai eram de mult studenți, eu unul dintre ei, ne-am bucurat, sincer vă spun, pentru că am presupus și așa a și fost, că numai acolo se putea realiza un om de asemenea valoare.

Surpriza mare a fost, că și atunci când s-a întors, o parte l-au aplaudat, iar o parte l-au invidiat. Noi îi simțeam pe acești oameni periferici și simțeam cine este profesorul Nicolae Simionescu. Nu este adevărat că el era concentrat numai aici în institut, toată lumea știa cine este profesorul Nicolae Simionescu. E adevărat că, dacă cineva l-ar fi lăsat să se desfășoare, în timpul perioadei cât a fost profesor la Universitate, în domeniul umanistic-cultural, ar fi fost și mai frumos pentru noi, tinerii de-atunci, să vedem și celelalte fațete pe care dânsul le-a avut și le-a exprimat într-un mod sau altul.

I.T. Niculescu, spunea odată că "a trăi în sufletul și idealurile elevilor este o formă de nemurire, care înalță pe om mai mult decât propria sa operă științifică". Nu știu dacă e chiar a lui I.T.Niculescu această formulare, dar mi-a placut totdeauna, i se potrivește profesorului Nicolae Simionescu. Eu nu pot pretinde a fi elevul său. Am fost un elev al său în școala "primară" și probabil că acest model m-a ajutat să fac ceva ,daca am făcut ceva. William James spune că "mai ușor se reușește prin exemple, decât prin îndemnuri". Prof. Simionescu este tipul de om de știință, tipul de creator, ființa umană aproape enciclopedică, sigur enciclopedică, dar dacă ne referim la realizările sale științifice, ele se concentrează foarte mult, cum era normal, pe domeniul biologiei si patologiei celulare; dar un om, un alt om de știință de o asemenea complexitate, eu nu cunosc.

Închei cu ceea ce spunea la un moment dat Gabriel Liiceanu într-o lucrare a sa; vorbea de faptul că fiecare om își construiește de-a lungul vieții un "edificiu afectiv". "Fiecare om sănătos cu o pregătire mentală normală și cu o pregătire culturală normală, fiecare om există, continuă să existe, supraviețuiește, apărându-se prin acest "edificiu afectiv" din care fac parte cei apropiați, prietenii, oamenii de știință, profesorii care sunt în viață, care nu sunt în viață, oricine altcineva care te sprijină, te ajută să continui să exiști și să faci ceva. Fară acest edificiu afectiv, nu poți continua, nu poți exista, nu poți să faci nimic".

Sunt fericit să vă spun că profesorul Nicolae Simionescu face parte din edificiul meu afectiv chiar dacă dânsul nu o știe.

PREGĂTIRI DE LANSARE

DR. CONSTANTIN NEACȘU
Primul Director Adjunct al
Institutului de Biologie și Patologie Celulară

Sigur, începuturile acestui institut sălășluiesc în inima celui care a rămas pentru noi: Profesorul. Și chiar dacă astăzi, fizic, nu este aici, spiritul lui veghează asupra acestui sălaș al științei așa cum și l-a imaginat și pe care sper că urmașii să nu-și precupețească eforturile pentru a-l menține la valoarea pe care dânsul i-a conferit-o. Așadar la început a fost un Om care avea carisma cercetării și dăruirii totale în această viață. El a avut firesc două mâini: una dreaptă - Maya și una stângă care, la un moment dat, am fost eu.

Profesorul s-a zbătut ca această clădire să se nască așa cum o concepuse. Am preluat acest deziderat creator încă de la începuturi, adică în anul 1976, când m-am alăturat gândurilor sale privind această frumoasă și unică realizare pe tărâmul românesc. Inițial, acceptat de conducătorii vremii ca Centru de Cercetare, pe măsura consolidării perspectivei sale științifice, ca formator de cercetători în ale biologiei celulare, s-a impus firesc ca primul Institut de Biologie și Patologie Celulară. Planurile au fost desenate de Nicolae Simionescu până la detaliul scaunului de lucru și locul fiecărui aparat din laborator pentru asigurarea unui anume flux al cercetării. Când mi le-a arătat, am fost pur și simplu captat de ideile sale, de condițiile deosebite pentru cercetare de metodologia formatoare a cercetătorului tânăr în domeniul atât de evident interdisciplinar al biologiei celulare.

Din 1976 am supravegheat permanent lucrările de lucrările de construcție. Legătura cu Profesorul se făcea printr-o permanență telefonică cu SUA, unde soții Simionescu lucrau la transplantul științific al cercetării celulei endoteliale în țara noastră. Proiectul a fost realizat după schițele Profesorului la Institutul de Proiectare al Ministerului Educației de către remarcabilul arhitect Antonescu și de către inginerul constructor Constantin Buzdugan. Lucrările au demarat cu Grupul de construcții 8, dar ca urmare a nemulțumirilor raportate împreună cu ing. Petruc, din partea noastră, a beneficiarului, am terminat cu Grupul de construcții 5. Am urmărit zi de zi desfășurarea lucrărilor (luându-mi un concediu din activitatea științifică) împreună cu

ing. Teodor Petruc, astăzi și el plecat dintre noi, ca și arhitectul Antonescu.

In 1977, când cutremurul din 4 martie a zguduit orașul, clădirea ajunsese la primul etaj. Prin hotărârea guvernamentală, se opresc lucrările la noile construcții, pentru a se trece la consolidări. Prin demersurile făcute pe plan local, prin eforturi de culise, am stabilit ca această clădire să fie considerată de „amploare medie" pentru a putea fi continuată. S-au ridicat ziduri, s-au dărâmat ziduri până s-a înțeles că această construcție trebuie să iasă perfect.

Îmi revin în minte unele trăiri ale momentului, acum când în ceața timpului scurs, aproape un sfert de secol, s-a consolidat doar nostalgia. Într-o zi, maistrul șef, care simțea că nu-l pierd din ochi, îmi spune "Tovarășe doctor, mă întreb dacă ați făcut instructajul de protecția muncii?" La răspunsul meu negativ, mă avertizează că mai poate cădea câte o cărămidă, se mai poate dezmembra câte un element de la o schelă sau mai știi ce alte accidente. Replica a sosit la ședința obișnuită de sâmbătă, ce avea loc în prima cameră terminată de la parter, actualul sediu al serviciului economic, așa zisul comandament de analiză a lucrărilor împreună cu beneficiarul. Atunci l-am îndemnat pe șeful șantierului care stătea alături de mine să arunce o privire zidului în care era montată ușa. Observând evidenta diferență de verticalitate de aproximativ 20 cm, ing. Stefănescu i-a cerut tocmai acelui maistru șugubăț să mai dărâme un zid. Trec peste acoperirea a șase perforații din dreptul culoarelor de trecere, ce nu fuseseră șterse din planurile proiectanților după unele modificări, ca să mă opresc la un aspect mai pitoresc care probabil a trebuit să rămână ca un stigmat al constructorului într-o clădire. L-am botezat "cuiul lui Pepelea" și se află la etajul trei, la sala de operații animale, pe peretele din stânga și constă într-o bucată de fier beton care iese din zid, fără să acopere nici o utilitate și care a fost ocolit cu grijă de faianțar și vopsit în culoarea camerei. Tot în acel an, 1977, se ajunsese la etapa placării laboratoarelor cu faianță de culori diferite pentru fiecare nivel. Acest deziderat important era pe cale de a nu se mai efectua, după ce constructorul ne anunțase că producția de faianță colorată fusese periclitată de cutremur. Prin profilul meu de medic endocrinolog cu activitate în domeniul oncologic, am obținut redistribuirea unei cote de faianță colorată, atât cât aveam nevoie și care mai este și astăzi în clădire.

In 1978, profesorul Zarnea, directorul general al Institutului Central de Biologie, s-a pomenit cu o adresă de la Ministerul Educației prin care era pus în situația de a "înfia" pe schema sa, temporar, încă un director adjunct, în persoana celui care vă vorbește. Era momentul în care se desfășura activitatea de constituire a decretului de înființare a Institutului de Biologie și Patologie Celulară. În cursul acelui an, 1978, odată cu etapele de finisare a construcției, a preluării spațiului de lucru cameră cu cameră, a primirii aparaturii de cercetare: microscoape Philips de ultimă generație, ultracentrifugi de înaltă performanță, camere frigorifice și ele ultimul tip și a sticlăriei a început forfota amenajării spațiilor de lucru. Microscoapele electronice au venit

într-o geroasă lună de iarnă, și deși ambalate de fabricant, pentru că o perioadă au trebuit să rămână în curte, am simțit la unison nevoia să le protejăm în plus: ne-am scos toții hainele de iarnă și le-am pus peste cutiile cu microscoape. Era grija adevăraților oameni de laborator pentru prețioasele lor jucării. A fost o trăire sinceră, iar pasiunea profesorilor Simionescu a fost repede captată de primul grup de cercetători și tehnicieni la acel moment de început.

În septembrie 1979, Profesorul și Maya erau în țară și trebuiau să prezinte noul institut atât în lumea științifică românească, cât și internațională. Invitați de peste hotare, personalități marcante și laureați ai premiului Nobel: Palade, de Duve, Sabatini, Farquar, Franke, Blobel trebuiau să sosească pentru inaugurării. Un mesaj telefonic ne anunță că nu se poate ține simpozionul inaugural deoarece nu avem nici o aprobare (ceea ce era adevărat, dar Profesorul nici nu a crezut firesc că ar trebui să cerem). Două acțiuni de urgență au pornit în paralel: Profesorul la Minister explica imposibilitatea de a amâna Simpozionul, noi în Institut am început să ne donăm salariile pentru 6 luni - un an, pentru a acoperi biletele de avion ale invitaților. Profesorul a învins inerția și opacitatea guvernanților vremii și în final am am reușit să-i avem pe invitați la inaugurare. A fost primul nostru mare succes. Deschiderea oficială a Institutului a marcat împlinirea visului unui temerar în propășirea științei românești. Acum Profesorul se putea apleca liniștit asupra misterelor celulei endoteliale spre a-i descoperi tainele și spre a defini fenomenul de transcitoză.

UN OM, O IDEE - SUSȚINEREA ADEVĂRATELOR VALORI

DR. DOINA VELICAN
Membru al Academiei de Științe Medicale

A vorbi despre Academicianul Nicolae Simionescu după emoționantele cuvinte rostite de distinsele personalități care l-au omagiat în această sesiune comemorativă nu poate decât să impună potrivirea mersului după urmele pașilor anteriori. Este greu să găsesc alte fraze elocvente pentru a-l evoca în această clădire unde plutește și domnește umbra sa vie. Aș putea spune că oamenii de statura sa sunt făclii care, la răscruce de drumuri, luminează toate căile care se îndreaptă spre direcții diferite.

Profesorul Nicolae Simionescu a fost deopotrivă cercetător pasionat, creator de școală, organizator de instituții. Încercând să găsesc un numitor comun tuturor acestor activități, eu l-am perceput pe Prof. Simionescu drept omul dedicat ideii de a susține și promova valorile autentice. Valorile au totdeauna timpul lor, care nu trece nici azi, nici mâine, niciodată. Profesorul N. Simionescu era din spița rară a celor care caută valorile și descoperindu-le, le deschid drumul printr-un generos efort propriu. Acest impuls și-a pus amprenta pe tot ce și-a propus și a reușit să realizeze în prea scurta sa viață. În slujba acestei idei și-a angajat puterea de gândire, o bogăție de mijloace și o mare încordare a voinței.

S-a spus despre Prof. Simionescu că a avut curaj și noroc, dar nu există vânt prielnic decât pentru cel care știe în ce direcție se îndreaptă. Prof. Simionescu a avut vocație de constructor. Se pare că acest morb l-a împărțit nu numai cu Maya Simionescu ci a fost transmis și genetic în generația mai tânără a familiei sale. O construcție durează numai dacă este solidă înglobând "structuri" de valoare autentică. În acest spirit, Prof. Nicolae Simionescu, împreună cu Maya Simionescu și ajutați de micul grup de fondatori, au creat Institutul de Biologie și Patologie Celulară care astăzi îl poartă numele.

Condus de ideea că nu există bun, ci numai cel mai bun, Profesorul Simionescu a gândit acest Institut nu ca o instituție obișnuită, normală, ci ca una de nivel comparabil cu cele mai bine cotate institute din lumea științelor biologice. Existența și evoluția dinamică a institutului probează că această creație a reușit să se lanseze în competiția mondială

generată de rapida dezvoltare a cercetărilor de biologie și medicină din ultimele decenii.

Alte două "construcții" subsumate proiectului de bază, respectiv "echipa" și "tematica de cercetare" au fost realizate tot în virtutea ideii de promovare a valorilor. Este proverbial efortul Profesorilor Simionescu de a căuta și a atrage tinerii absolvenți cei mai bine dotați și pregătiți, de la Facultățile de diverse specialități necesare pentru echipa institutului. Conștient că în viață nu ai decat atat cât dai, Profesorul Simionescu nu a ezitat să dea girul său celor care făceau dovada de inteligență și cunoștiințe solide, uitand să citească fila cu antecedente personale și familiale. Chiar în împrejurări neprielnice a depus eforturi susținute de a deschide drum celor care într-adevăr meritau să fie susținuți și cărora le-a stimulat creativitatea, spunand unor înalte exigențe.

Alegerea proiectelor de cercetare s-a situat pe aceeași orbită de căutare a valorii autentice. Institutul a propus totdeauna proiecte de amplă respirație și mare actualitate, competitive cu cele lucrate în importante centre de cercetare din comunitatea științifică internațională. Au fost astfel obținute rezultate remarcabile prin continuarea studiilor asupra endoteliului și altor structuri vasculare, asupra interacțiunilor celulare și moleculare în bolile cardiovasculare, în farmacologia celulară ș.a. Înzestrat cu o gândire efervescentă, alimemtată prin studiu neîncetat, Profesorul avea talentul de a coborî cu ușurință din sfera gândirii către lumea realității, pentru a închega în idei noi bogata varietate a faptelor.

O altă construcție a Profesorului Simionescu este Societatea Națională de Biologie Celulară, creuzet în care s-au contopit energiile adunate din toată țara și din toate disciplinele asociate, pentru a da o structură solidă, încorporând aceleași principii de exigență și stimulare a valorilor. În acest context nu pot să nu amintesc memorabilele ședințe de Consiliu în care, Profesorul Simionescu, cu discreție și tact, veghea ca aceste principii să fie strict respectate. Și în sfârșit, last but not least, trebuie subliniat rolul Prof. Nicolae Simionescu în organizarea secției de Științe Biomedicale a Academiei de Științe Medicale. Am amintiri de neuitat din anii imediat după 1990, cand întrunirile de organizare, ținute sub conducerea sa, se prelungeau ore în șir, căutând să se stipuleze noi și noi criterii de evaluare a contractelor propuse sau de primire de noi membri, criterii care să ridice ștacheta exigențelor și impunerea valorilor reale.

Se consideră că o carte este bună dacă a spus tot ce trebuie despre subiect, dacă a spus numai ce trebuie și dacă a spus cum trebuie. În fața acestor dure exigențe, greu de îndeplinit când se vorbește despre o personalitate atât de complexă cum a fost Profesorul Nicolae Simionescu simt că este momentul să închei.

Dacă îl credem pe Seneca (și de ce nu l-am crede) viața este ca o poveste: ceea ce contează nu este lungimea, ci valoarea ei. Academicianul Nicolae Simionescu a dispărut, căci a trebuit să plătească birul neînduplecat al naturii: a lăsat însă în urmă o mare dungă

de lumină. Zilele trec greu, anii trec repede. Și toate generațiile viitoare de cercetători din acest institut sau din alte locuri vor întâlni mereu numele Prof. Simionescu atașat de tot ce a gândit și a făptuit, de toate valorile pe care le-a susținut cu generozitate.

Cu speranța că amintindu-ne de cei care au fost, pot fi încurajați cei care vin, vă rog să-mi permiteți să aduc Profesorului prinos de recunoștință pentru că, în lungul drum spre eternitate, s-a oprit o clipă, acum și aici, alături de noi.

Requiescat in pace.

PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU – CREATORUL ŞCOLII ROMÂNEŞTI DE BIOLOGIE CELULARĂ ŞI MOLECULARĂ

DR. ANCA SIMA
Institutul de Biologie şi Patologie Celulară
"Nicolae Simionescu"
Membru Corespondent al Academiei Române

Invincibil, primul în tot ce făcea, interesat în toate, cu un umor sclipitor, unic... şi totuşi atât de apropiatul nostru "domn' Profesor". Calităţile lui de om complet impuneau sentimente de respect, de devotament, precum şi de firească admiraţie. O parte din fiecare dintre noi parcă s-a destrămat odată cu trecerea lui în veşnicie. Marile lui calităţi de om de ştiinţă, de pedagog devotat, de inegalabil spirit organizatoric i-au permis să se impună cu prestanţă în literatura biomedicală mondială, şi să creeze Institutul de Biologie şi Patologie Celulară (IBPC), model de probitate ştiinţifică, de şcoală românească de prestigiu şi de promovare a unei ştiinţe impregnate de umanism.

Anul 1981 - a doua sesiune ştiinţifică anuală a IBPC - domnul Profesor deschide lucrările:

„Această sesiune ştiinţifică, în care prezentăm cu sfială unele din rezultatele noastre, o dedicăm ideii că cercetarea fundamentală în biomedicină este, prin obiectul ei OMUL, cea mai aplicativă dintre cercetări, deoarece se adresează OMULUI, nu numai ca fiind pateticul nostru CAPITAL, dar neîndoielnic UNICUL PRODUCĂTOR AL ORICĂREI ALTE CERCETĂRI".

Observaţi cum omul de ştiinţă român însumând cele mai multe citări în lucrări internaţionale de specialitate prezintă „cu sfială" rezultatele cercetărilor.

Domnul Profesor ne-a cucerit pe toţi prin modestie şi onestitate, prin francheţe şi căldură, maniera elegantă de a-şi trata colegii de toate vârstele, spiritul deschis şi elevat, distincţia cu totul deosebită. În anii cei mai sumbri ai dictaturii, sub vremi caracterizate de o scară de valori răsturnată şi de o criză fundamentală de modele, domnul Profesor a fost pentru noi toţi, elevii lui, un model şi un adevarat "antrenor"

care ne-a ținut activi, ne-a stimulat inteligența și ambiția, ne-a susținut realizările; a fost și va rămâne atât pentru noi, cât și pentru multe alte generații de tineri un simbol al tenacității și puterii de a crea prin muncă valori universale. Ne-a lăsat o amintire care ne însoțește, ne luminează, ne încălzește și susține în clipele când ne căutăm rațiunea de a fi.
Profesorul George E. Palade, laureat al Premiului Nobel pentru medicină spunea: ***"În decada 1980, Nicolae şi Maya Simionescu au ajuns să fie recunoscuți pe plan mondial ca lideri în cercetarea endoteliului vascular şi IBPC a ajuns să fie unanim considerat ca un important centru de avangardă în acest domeniu. Ambele poziții au fost consolidate în continuare de cercetările modificărilor incipiente care afectează peretele vaselor mari, susceptibile de a dezvolta leziuni ateromatoase.***

Cel mai important semn al recunoaşterii mondiale au fost cele trei granturi (de-a lungul a 9 ani) acordate de National Institute of Health pentru IBPC, la solicitarea lui Nicolae Simionescu. Au fost primele şi singurele granturi acordate unui institut de cercetare din Europa de Est, într-o perioadă în care granturile acordate unor institute din afara SUA reprezentau doar un foarte mic procent din total. Aceste granturi au făcut posibilă achiziționarea de reactivi şi echipamente de pe piața vestică şi organizarea de simpozioane internaționale in IBPC pe teme de interes general în biologia endoteliului, inclusiv transcitoza proteinelor şi lipoproteinelor şi rolul lor în dezvoltarea leziunilor aterosclerotice. La aceste conferințe au participat cercetători americani de înalt prestigiu din fiecare domeniu menționat mai sus. Americanii au fost plăcut surprinşi să constate că în realitate ei au învățat mai mult de la cercetătorii români decât cercetătorii locali de la ei. Asta nu se întâmplă deseori in lume; rezultatele se datoresc felului în care a fost organizat acest institut si principiilor lui de funcționare."

Evaluarea statistică a rezultatelor între anii 1980-1995 arată că echipa de la IBPC, inspirată și condusă de profesorii Maya și Nicolae Simionescu, a publicat 30 de capitole de carte și peste 100 de articole la prestigioase edituri și reviste din străinătate (SUA, Canada, Anglia și Germania) și a participat cu comunicări la peste 35 congrese și simpozioane internaționale.

Calitativ (ceea ce este adevărata măsură a cercetării), în IBPC s-a demonstrat pentru prima oară: (a) conceptul de transcitoză, termen dat de Prof. Nicolae Simionescu (asociat transportului transendotelial prin vezicule plasmalemale) și transcitoză mediată de receptori; (b) permeabilitatea endotelială variază de-a lungul întregului arbore vascular, precum și la nivelul unei singure celule endoteliale; (c) celula endotelială prezintă receptori pentru albumină pe care îi folosește în transportul transendotelial al acestei proteine; (d) receptorii pentru histamină sunt concentrați în special în venule - spre deosebire de arteriole și capilare - explicând topografia predominant venulară a creșterii permeabilității vasculare în inflamație (un fenomen

care i-a intrigat pe patologi aproape un secol); (e) primul moment detectabil în ateroscleroză este acumularea lipoproteinelor modificate în subendoteliu.

Directorul Institutului Pasteur din Paris, Maxime Schwartz, afirma despre Profesorul Nicolae Simionescu:
"A fost un strălucit om de ştiinţă, de reputaţie internaţională, care a adus o importantă contribuţie la cunoaşterea modernă a celulei. Domnul Simionescu, pe care am avut ocazia să-l cunosc personal, a fost un remarcabil organizator şi un animator entuziast al cercetării ştiinţifice". Pentru România, aceasta s-a tradus în organizarea şi conducerea între anii 1982-1995 a Societăţii Naţionale de Biologie Celulară (SNBC), care a devenit extensia micuţului nucleu de cercetare din IBPC, transformându-se în şcoala românească de biologie celulară şi moleculară.

Anul 1989, anul culminant al prigoanei ceauşiste îndreptate mai ales împotriva culturii şi ştiinţei; în IBPC se organizează, la iniţiativa şi sub organizarea Profesorului Nicolae Simionescu, comemorarea Eminescu. Au luat atunci cuvântul profesorii Zoe Dumitrescu Buşulenga, Mihai Dragănescu şi sculptorul Ovidiu Maitec, creatorul bustului lui Eminescu; au participat numeroşi oameni de cultură care au umplut până la refuz auditoriul Institutului.

În deschidere, domnul Profesor a explicat de ce se comemorează Eminescu într-un institut de cercetare:

„De la crearea lui, Institutul nostru a fost o instituţie de cultură în care se lucrează ştiinţă. Această concepţie are la bază două idei general acceptate: 1) ştiinţa este parte a culturii; 2) cultura înseamnă trei lucruri: creaţie, asimilare şi transmitere de valori. Cu acestea in minte, iată-ne acum zece ani, la începutul activităţii Institutului, înconjuraţi de un grup de tineri - foarte tineri colaboratori - deosebit de înzestraţi şi entuziaşti. De la început noi, cei doi seniori, am avut sentimentul responsabilităţii de a le asigura nu numai aparate, chimicale şi cărţi, ci şi condiţii pentru o formare complexă, în care să se îmbine armonios un înalt profesionalism cu o largă şi nesaturată deschidere spre mesajele perene ale culturii".

A continuat apoi, lansând un mesaj care şi azi este foarte actual:

"Să vorbim azi de o ECOLOGIE A CULTURII la care avem datoria de a participa activ pentru identificarea şi combaterea surselor de poluare şi a gravelor efecte pe care le pot avea asupra purităţii şi viabilităţii moştenirii spirituale pe care o transmitem viitoarelor generaţii. Pentru orice societate, inclusiv a noastră, progresul depinde de capacitatea de a crea "masa critică" de oameni demni, fermi şi capabili să orânduiască natural scara valorilor, împotriva poluantei non-valori. O comunitate ştiinţifică care priveşte spre viitor, inclusiv acest mic şi modest

institut, este vital interesată nu atât în a redefini "lumea ca ne-lumea" şi nici de a-i separa (aşa cum spune Eminescu) pe "smintiți şi pe mişei", ci în primul rând în a identifica, promova şi ocroti aceste realități care poartă în ele permanența spiritului şi geniului creator al poporului nostru. Asta implică să urâm apatia şi această comemorare este o luptă împotriva apatiei, pentru că aşa cum spunea un celebru gânditor "nepăsarea este treapta cea mai de jos a libertății ".

Ce alt model mai frumos şi mai viu puteam noi, tinerii din IBPC, căuta şi găsi? Ce şansă extraordinară pentru cei care l-au cunoscut şi pentru cei pe care el i-a iubit şi îndrumat în aventuri ale minții şi spiritului, în realizări ale ştiinței, dar şi autoevaluării şi autodepăşirii. Domnul nostru Profesor nu a avut timpul să ne lase un mesaj de adio. Dar cred că cele spuse la sesiunea SNBC 1989 pot fi şi acum un îndemn pentru noi toți:

„În epoca în care trăim, activitatea SNBC este o briză de cultură, un act de patriotism. Iar patriotism înseamnă în cazul nostru ştiință mai multă şi mai bună. Nu sunt vremuri simple, dar să avem un optimism activ. Şi să fim animați de sentimentul că prin această societate, împreună, am făcut să încolțească o mică floare. Şi asemenea Micului Prinț care îşi uda zilnic floricica pe care o sădise pe Mica lui Planetă, şi noi să îngrijim floarea noastră în năzuința că va deveni perenă. Şi nu numai să o îngrijim, ci şi s-o protejăm, pentru că aşa cum spunea anticul Ovidiu: fericit cel ce cutează să apere cu putere ceea ce iubeşte. Vă doresc cutezanță, putere şi mult succes".

La 6 februarie 1995, Profesorul Nicolae Simionescu a trecut din plină activitate, în legendă.

1980 - RECEPTORUL LA HISTAMINĂ, PRIMA VICTORIE, PRIMA CUPĂ DE ȘAMPANIE ÎN IBPC

DR. CONSTANTINA HELTIANU
Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"
Membru al Academiei de Științe Medicale

Viața este ca o poveste… Povestea receptorului la histamina a început în anul 1980. Un grup de tineri cercetători, proaspăt angajați în Institut, împreună cu Profesorii Maya și Nicolae Smionescu au început cercetările în IBPC. Printre aceste cercetări a fost și studiul receptorilor la histamină pe endoteliul vascular. Într-una din zile, Dl. Profesor Simionescu mi-a arătat o imagine dintr-o lucrare de a dânsului, care fusese recent publicată. Aceasta reprezenta un diafragm de șoarece. Animalul a fost injectat intra venos cu cărbune. După aplicarea topică de histamină pe diafragmul animalului, cărbunele din lumenul vaselor de sange a pătruns în spațiul subendotelial. Fenomenul care s-a observat prin microscopie optică, a apărut preferențial la nivelul venulelor și s-a realizat probabil datorită contracției celulelor endoteliale, care și-au deschis joncțiunile și au lăsat cărbunele să pătrundă în țesut, printre ele. Astfel, s-a observat o marcare specifică a venulelor, în comparație cu celelalte microvase, ca de exemplu arteriolele. Oare efectul histaminei, de contracție a celulelor endoteliale, se produce printr-un mecanism de receptori? Și Dl. Profesor mi-a zis: Ce-ar fi să prepari un conjugat care sa fie și electrono-opac și să conțină și histamină. Folosirea lui poate ne va da o indicație că există pe membrana endoteliului vascular receptori la histamină. Oare cum sunt ei distribuiți? Imaginează-ți că un astfel de conjugat ar putea să producă o marcare a venulelor ca și în cazul experimentului cu cărbune.

Profesorul avea un dar teribil să te facă să-ți imaginezi experimentele. Și ceea ce și-a imaginat s-a confirmat. Conjugatul histamină-feritină preparat a fost purificat, verificată puritatea și testată capacitatea de a-și păstra activitatea biologică a histaminei. Prin perfuzarea conjugatului în vasele de sange și analiza electrono-microscopică a preparatelor am obținut răspunsurile la întrebări. Da. Sunt receptori la histamină pe membrana endoteliului vascular. Aceștia sunt preferențial distribuiți pe endoteliul venular, mai puțin în capilare și aproape deloc în arteriole. Conjugatele histamină-feritină sub formă de mici agregate au produs o marcare a venulelor

asemănătoare cu cea pe care Dl. Profesor o observase anterior în experimentele cu cărbune administrat la șoarece. Ce s-a mai bucurat! A fost prima realizare din Institut, în cinstea căreia cu toții am ridicat o cupă de sampanie.

Cercetători din comunitatea științifică internațională au apreciat aceste realizări. Astfel, Profesorul Guido Majno spunea:

„Cum sunt selectate venulele? Este uşor de răspuns, folosind complexe de histamină cu feritină (care este vizibilă prin microscopie electronică), Heltianu et al. au arătat că endoteliul venular are mai mulţi receptori la histamină decât endoteliul din alte părţi ale arborelui microvascular (Cell, Tissue and Disease, 1994, 375)”.

Aceste rezultate au fost prezentate în toamna aceluiași an, 1980, la congresul internațional de biologie celulară de la Berlin (pe atunci, de Vest). Împreună cu Dl. Profesor un grup de tineri cercetători a mers la acel congres, pentru mulți din noi fiind prima ieșire din țară și prima participare la un congres științific. Și povestea continuă… și astăzi… cu alt subiect… cu alți cercetători… dar din păcate fără Profesorul nostru…

DE LA SITUSURI DE LEGARE A ALBUMINEI LA RECEPTORUL PENTRU ALBUMINĂ

DR. DOINA POPOV
Institutul de Biologie și Patologie Celulară
"Nicolae Simionescu"
Membru Corespondent al Academiei Române
Membru al Academiei de Științe Medicale

Într-o scrisoare din 1978, referindu-se la conținutul științific al Congresului Anual al Societății Americane de Biologie Celulară, Dl. Profesor făcea următoarea remarcă perfect valabilă și azi :

„Este impresionant cât de mult şi bine se lucrează. Fiecare se restrânge din ce în ce mai mult pe o sub-problemă, şi asta e valabil şi pentru întregi departamente sau institute. Altfel, tematica majoră rămâne aceeaşi, deoarece ignoranța noatră e încă atât de largă".

O astfel de sub-problemă este transportul proteinelor din plasma, prin endoteliu, spre fluidul interstițial. Pentru identificarea căilor de transport se foloseau in acea vreme trasori, substanțe chimice. Ideea Profesorilor Nicolae și Maya Simionescu a fost de a utiliza în loc de substanțe chimice, trasori fiziologici, LDL sau albumină. Perfuzand albumină adsorbită pe Au coloidal în patul vascular pulmonar s-a constatat că acest complex este preluat din lumen de veziculele plasmalemale (caveole) endoteliale și de domeniile fără înveliș ale plasmalemei luminale. In timp, veziculele ce transportă Alb-Au traversează endoteliul și, în final, complexul este descărcat către spațiul subendotelial. Procesul este specific, deoareace alte proteine (fibrinogen, fibronectină) adsorbite de Au nu decorează caveolele, iar un exces de Alb perfuzată alături de Alb-Au reduc legarea. În acest moment s-au ridicat două întrebări: 1. Acest transport preferențial are loc și în alte paturi vasculare decat plămânul? și 2. Există cumva proteine responsabile de acestă legare specifică, și dacă da, care sunt acelea?

Răspunsurile au venit relativ repede: 1. Capilarele din miocard, din țesut adipos și din microvasculatura periepididimală prezintă o legare selectivă a Alb-Au de veziculele plasmalemale. 2. Deoarece studiile de perfuzie in situ au fost realizate cu un ligand polivalent,Alb-Au, au fost imaginate experimente în care să se interacționeze un ligand monovalent, monomeri ai radioiodinați ai Alb cu o singură specie celulară, celulele

endoteliale aortice bovine. Rezultatele au arătat că legarea albuminei radioiodinate de celulele endoteliale are loc după o curbă de saturare, diagrama Scatchard aratand o valoare K_D de ordinul 10^{-12} moli, deci o afinitate mare, ce corespunde la 10^5 situsuri de legare/celulă. Datele cinetice indică o interacție puternică între Alb și celule mediată de receptori specifici.

Prof. Guido Majno aprecia că descoperirea receptorilor pentru Alb ai CE este cea mai importantă contribuție la fiziologia endoteliului de la legea lui Starling (elaborată în urmă cu 100 de ani, această "lege" arată că peretele capilarelor se comportă ca o membrană semipermeabilă, capabilă să rețină proteinele), sau mai exact de la demonstrarea transportului vezicular de către Profesorul Palade.

A început astfel un nou proiect: identificarea și caracterizarea proteinelor responsabile de legarea albuminei ("albumin binding proteins" - ABP). Identificarea ABP a fost realizată prin două tipuri de metode: ligand-blotting și immunoblotting. S-au examinat celule endoteliale din microvasculatură în care se evidențiaseră situsuri de legare a Alb, celule endoteliale aortice – pe care se realizaseră studiile cinetice -, fibroblaste implicate în catabolismul Alb, celule musculare netede care folosesc acizii grași transportați de Alb și adipocite care depozitează acizii grași. Cu excepția celulelor sanguine anucleate, toate celulele examinate exprimă prin ligand-blotting cu Alb-Au sau Alb radioiodinat două seturi majore de polipeptide ale ABP de Mr 18 și 31 kDa. Aceleași polipeptide au fost evidentiate și în extracte de inimă și în cardiomiocite interacționate cu albumina serică monomeră anionizată sau tratată cu formaldehidă. La nivelul patului vascular pulmonar experimentele de ligang-blotting au arătat faptul că legarea Alb radioiodinate de ABP decurge după un proces saturabil și competiționabil de un exces de Alb nemarcată. Experimentele de imunoblotting au constat din următoarele: proteine din celule endoteliale aortice, celule microvasculare și plămân au fost transferate pe nitrocelulză și reacționate cu un anticorp antiidiotipic anti-albumină și, în continuare, cu proteina A radioiodinată. Controalele au constat din reactie cu un IgG preimun și din competitionarea specifică a legării anticorpului în prezenta albuminei în exces. Rezultatul este identic celui obținut prin ligand blotting: seturile ABP de masă moleculară 18 și 31kDa.

Proprietățile biochimice ale ABP: rezistența la acțiunea agentilor reducători, pI 8,05 pentru 31kDa și 8,55 pentru 18kDa. A fost descifrată parțial secvența de aminoacizi ai ABP de 18 kDa: 12 aminoacizi corespund ciclofilinei, iar primii 8 au un caracter hidrofob.

Localizarea celulară a ABP. Pentru a cerceta dacă ABP este expus de membrana apicală a celulelor endoteliale, albumina a fost reacționată cu suprafața celulară cu ajutorul unui ligand bifuncțional (SASD, sulfosuccinimidil- azido salicil amido- ditio propionat), iar după fotoactivare și autoradiografie a fost evidențiată prezența

benzilor ABP, alături de două peptide oligomere. O abordare suplimentară a format-o imunoprecipitarea BAEC rodioiodinate la suprafața apicală cu un anticorp antiidiotipic antialbumină. Autoradiografia arată că anticorpul a precipitat numai proteinele ABP de masă moleculară 18 și 31 kDa. La nivel subcelular, ABP de 18 kDa a fost localizat la nivelul membranei caveolelor. La nivelul cardiomiocitelor a fost evidențiată, de asemenea, prezența ABP. Curba Scatchard indică o afinitate mare a legării albuminei de sarcolema cardiomiocitelor.

Rolul ABP. După traversarea endoteliului cu participarea ABP din veziculele plasmalemale complexele albumină acizi grași ajung în vecinătatea sarcolemei cardiomiocitelor. La acest nivel ABP funcționează ca o moleculă de ancorare complexele albumină acizi grași se disociază iar acizii grași (sursă energetică a inimii) pătrund în cardiomiocit prin difuzie simplă prin membrană sau transportati de FABP membranar. Rămâne de stabilit rolul fiziologic al ABP expus de plasmalema abluminală a endoteliului. Cercetările asupra ABP au fost continuate și în alte laboratoare din lume, din Belgia - grupul profesorului Uriel, din SUA - grupul profesorului Palade. Existenta ABP a fost demonstrată și în viruși și bacterii. ABP reprezintă astfel, un exemplu de receptor conservat pe parcursul evolutiei cu funcția unică de recunoaștere a albuminei ne-alterată.

TRANSCITOZA MACROMOLECULELOR PRIN ENDOTELIUL VASCULAR - UN CONCEPT PRELUAT DE COMUNITATEA ȘTIINȚIFICĂ INTERNAȚIONALĂ

DR. FELICIA ANTOHE
Institutul de Biologie și Patologie Celulară
"Nicolae Simionescu"

A trecut aproape un deceniu de când Domnul Profesor Nicolae Simionescu nu mai este printre noi, însă spiritul său inovator, dăruirea sa pentru descifrarea tainelor biologiei celulare și moleculare sunt încă aici, în institutul nostru, le-a sădit în fiecare dintre noi cei care l-am cunoscut, și prin noi, în noile generații de tineri cercetători care au trecut sau vor mai trece prin aceste laboratoare. Prezența sa se face simțită la tot pasul, îl regăsim în lucrările și cărțile din bibliotecă, în protocoalele de lucru din laboratoare, în amintirile noastre reflectate în numeroasele fotografii din albumul institutului, în întreaga concepție de organizare a lucrului în institut și nu în ultimul rând, în privirea pătrunzătoare și plină de forță cu care ne privește din portret.

S-a străduit să nu ne lipsească nimic ca să ne dezvoltăm și să câștigăm un loc de prestigiu în cercetarea biomedicală, așa cum părinții nu precupețesc nici un effort în educarea și creșterea copiilor. Pentru că IBPC este "copilul", creația materială și spirituală a Domnului Profesor Nicolae Simionescu și a Doamnei Academician Maya Simionescu. Ne-au obișnuit cu punctualitatea, cu corectitudinea, cu munca perseverentă și exigentă, cu spiritul de echipă si colegialitate, cu disciplina dar și cu entuziasmul, optimismul, creativitatea și curiozitatea în munca de cercetare, una dintre cele mai nobile preocupări ale omenirii.

Ne-au protejat în vremurile grele, în această oază a cercetării științifice, ne-au adus cu eforturi proprii hrana zilnică necesară unei astfel de activități, chimicalele, cărțile și revistele de specialitate necesare, prin grant-uri cu NIH USA, dar și prin donații personale deloc de neglijat, ne-au pus în mână pipeta și ne-au dezvăluit lumea minunată a celulelor, ne-au dojenit aspru când am făcut greșeli și ne-au arătat hotărât drumul care trebuie urmat, ne-au încurajat în momentele grele de disperare când rezultatele se lăsau cu greu dezvăluite și, nu în ultimul rând, ne-au învățat să ne păstrăm sufle-

tele tinere astfel încât toate obstacolele să fie mai ușor de trecut iar rezultatele și bucuriile noastre să le sărbătorim aici, împreună. Nu întâmplător la sărbătorirea a 10 ani de existență a IBPC Domnul Profesor și Doamna Maya Simionescu au primit din partea tânărului institut "Diploma pentru cea mai GRANT-ioasă activitate", reflexie a neobositei strădanii umane și științifice desfășurate în institut.

În aceste momente să ne aducem aminte cu pioasă recunoștință de Domnul Profesor, să nu-i trădăm așteptările, să ne ridicăm la înalta exigență cu care ne-a învățat și să ne bucurăm împreună de succesele noastre alături de "părinții nostri", să rămânem mereu alături, mereu împreună…. Și cum cea mai bună metodă de educație este exemplul personal, asa a făcut și Domnul Profesor, a fost primul care ne-a oferit exemplul de urmat. Unul dintre posterele prezentate la prima sesiune științifică a IBPC în 1980 era: "Transcitoza macromoleculelor prin endoteliul vascular" autor: Nicolae Simionescu. Colectivul de lucru s-a lărgit treptat și tema de cercetare propusă s-a dezvoltat generând un nou concept referitor la mecanismele de transport vezicular prin endoteliu, concept preluat ulterior de comunitatea internațională. Prin acest subiect de mare interes în cercetarea biomedicală se propunea studiul detaliat al mecanismelor de transport al macromoleculelor plasmatice prin endoteliul vascular către țesuturile subendoteliale. Endoteliul vascular, reprezentat de monostratul celular care căptușește toate vasele de sânge este un epiteliu înalt specializat în schimburile de substanțe și gaze dintre cele două compartimente lichide majore: sângele și fluidul interstițial. Experimentele efectuate sub îndrumarea Domnului Profesor și a Doamnei Maya Simionescu au evidențiat faptul că membrana plasmatică a endoteliului vascular prezintă o sarcină negativă heterogen distribuită generând o suprafață netrombogenă, dar și microdomenii lipsite de situsuri anionice. S-a observat că aceste microdomenii diferențiate din punct de vedere biochimic sunt asociate cu structuri membranare implicate fie in endocitoză (domeniile și veziculele cu înveliș), fie în transcitoză (veziculele plasmalemale, canalele și diafragmele asociate). Veziculele plasmalemale sau caveolele, fiind domenii membranare lipsite de situsuri anionice reprezintă cărăuși favorabili pentru proteinele plasmatice care sunt în marea lor majoritate anionice și sunt respinse de sarcina negativă a membranei plasmatice. Implicarea veziculelor plsmalemale în transportul macromoleculelor prin endoteliul vascular a fost postulată inițial de Profesorul George E. Palade în 1960.

În următorii ani s-au acumulat noi date și în 1979 Profesorul Nicolae Simionescu a atribuit fenomenelor de transport vezicular transendotelial denumirea de "transcitoză". Transcitoza utilizează aceleași mecanisme de bază ca și endocitoza, macromoleculele fiind transportate fie nespecific în fază fluidă sau prin adsorbție fie prin mecanisme specifice mediate de receptori prezenti pe membrana veziculelor plasmalemale. Spre deosebire de endocitoză în transcitoză purtătorii veziculari (caveolele) ocolesc compartimentele intracelulare (endozomi, lizozomi) transferând macromoleculele nedegradate în compartimentul opus în concordanță cu necesitățile țesuturilor suben-

doteliale. Numeroasele experimente in vivo, in situ sau pe culturi de celule au condus la concluzia ca veziculele plasmalemale sunt microdomenii membranare specializate. Ele au o compozitie lipidică unică și sunt lipsite de situsuri anionice puternice fiind implicate în procese majore de endocitoză și/sau transcitoză în celulele endoteliale. Acest lucru este susținut și de identificarea a numeroși receptori pentru macromolecule plasmatice, cum sunt: LDL, HDL, albumina, albumina glicată, insulina,.. și care au un rol foarte important în menținerea homeostaziei țesuturilor și a compartimentelor fluide din organism.

Conceptul de transcitoză ca și rezultatele obținute în IBPC au fost apreciate și de cercetători de pe alte meleaguri. Iată ce spunea Profesorul George Emil Palade, exprimând opinia delegației americane la sesiunea științifică 'Workshop on the Cell Biology of the Vessl Wall" din august 1983:

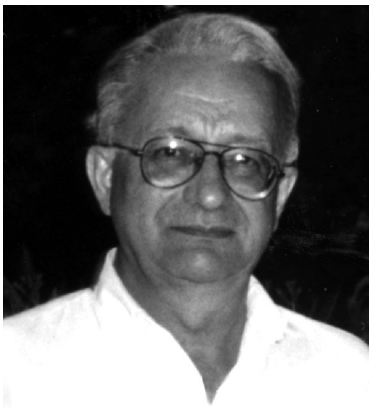
„…În momentul de față, volumul cercetărilor pe endoteliul vascular este mai important la IBPC decât în laboratoarele de la Yale University, Medical School, USA… Transportul macromoleculelor mari sau mici e un domeniu de cercetare vast… În prezent, acesta este un domeniu foarte activ de cercetare…"

La numai doi ani, când a avut loc "The Fourth US- Romanian Workshop on Biomedical Research" în mai 1985, Profesorul Palade sublinia:

„…Americanii au fost plăcut surprinsi să constate că în realitate ei au învățat mai mult de la cercetătorii români decât cercetătorii români de la ei. Asta nu se întâmplă deseori în lume. Se întâmplă rareori."

Un alt prieten al institutului, Profesorul Guido Majno, spunea atunci:
„The endothelium used to be a barrier… Let it now be …a link! Transcytosis ICBP-USA", sau altfel spus cercetarea nu are frontiere si transferul de informație și cunoștințe trebuie să reprezinte un bun al întregii omeniri.

PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU - SCHIȚĂ BIOGRAFICĂ



DR. VICTOR V. JINGA
Director Adjunct Științific al
Institutului de Biologie și Patologie Celulară
"Nicolae Simionescu"

Nicolae Simionescu s-a născut în București, la 27 iunie 1926. A frecventat cursurile liceelor "Dimitrie Cantemir", apoi "Sf. Andrei", susținând examenul de bacalaureat în 1944. Au urmat studiile de specialitate la Facultatea de Medicină din București, al cărei licențiat cu Diplomă de Merit devine în 1950. La aceeași instituție obține titlul de Doctor în Științe Medicale în 1966.

Câteva trăsături fundamentale ale personalității profesorului și savantului Nicolae Simionescu se manifestă cu pregnanță încă din tinerețe și îi marchează constant evoluția profesională: imaginația, spiritul de inițiativă, perseverența potențate de o capacitate de muncă ieșită din comun, de ordine și metodă, pasiune pentru activitatea de dascăl și de cercetător științific pentru care, potrivit spuselor profesorului G.E. Palade, "se născuse cu darurile necesare".

Între anii 1946-1970 funcționează la Catedra de Anatomie a Facultății de Medicină din București mai întâi ca preparator, asistent și, mai apoi, conferențiar și șef de departament. Concomitent își desăvârșește specializarea medicală ca extern, intern și secundar în chirurgie, până în 1957, după care, la Institutul de Endocrinologie București, desfășoară o activitate intensă de cercetare experimentală și clinică, fiind cercetător principal și șef al departamentului de morfologie (1957-1970). Din această perioadă de împliniri didactice și științifice în domeniile morfologiei, patologiei experimentale, chirurgiei și endocrinologiei datează și specializări în străinătate ca bursier al Uniunii Internaționale contra Cancerului la Institutul "Jules Bordet" din Bruxelles, Institutul "Gustave Roussy" din Paris și "National Institutes of Health", Bethesda, SUA (1968).

O mare și importantă cotitură în viața și evoluția științifică a profesorului Nicolae Simionescu este marcată de anul 1970, an în care se asociază la cercetările și activitatea didactică a Departamentelor de Biologie Celulară conduse de profesorul G.E. Palade, mai întâi la Rockefeller University, New York (1970-1973), apoi la Yale University, School of Medicine, New Haven, SUA (1973-1974).

Perioada americană și a doua perioadă românească reprezintă anii realizărilor și satisfacțiilor majore, alături de soția și colaboratoarea sa apropiată, Maya Simionescu, în domeniul biopatologiei celulare și moleculare a aparatului cardiovascular, cu o orientare specială asupra endoteliului și aterogenezei. Sunt anii afirmărilor științifice internaționale, a conceperii, realizării și conducerii Institutului de Biologie și Patologie Celulară din București, care îi poartă numele (1973-1979-1995), instituție esențială pentru dezvoltarea și afirmarea internațională a biologiei moderne din România.

Sunt anii înființării și coordonării catedrelor de biologie celulară în învățământul superior românesc, ai înființării Societății Naționale de Biologie Celulară, în 1982, al cărei președinte a fost. Sunt anii unei activități neîntrerupte și eficiente desfășurată în țară și în străinătate, cu rezultate științifice, didactice și organizatorice excepționale. Sunt descoperite și omologate apoi de către comunitatea științifică internațională (1) conceptele și termenii de "transcitoză" și "transcitoză mediată de receptor"; (2) liposomii extracelulari și lipoproteinele modificate și reasamblate, cea mai precoce modificare biochimică cu care începe ateroscleroza; (3) receptorul celular la albumină (albumin binding proteins) - în colaborare; (4) microdomenii diferențiate biochimic ale celulei endoteliale (în colaborare); (5) metode noi în biologia celulară - mordansarea cu galoilglucoza, izolarea celulelor endoteliale din inimă, noi trasori ultrastructurali de permeabilitate ș.a.

Activitatea științifică a profesorului Nicolae Simionescu a fost concretizată în peste 600 de articole originale, monografii, capitole de tratate, lucrări prezentate la congrese internaționale, apărute în străinătate, intre care 15 monografii, capitole de tratate, manuale și peste 300 articole și alte lucrări apărute în țară. Premii ale Academiei Române, ale Universității McGill din Montreal, Canada, Medalii ale unor Societăți Savante din Japonia, Canada, Franța, Italia, Austria, Grecia, precum și alegerea ca membru al Academiei Române (1990) încununează opera științifică a savantului.

A participat ca "Invited Speaker" la 24 congrese și simpozioane internaționale (SUA, Germania, Japonia, Franța, Mexic, Italia, Austria etc.) și a avut responsabilități organizatorice la 17 congrese internaționale. A fost consultant la 9 instituții științifice de mare prestigiu, printre care celebrele National Institutes of Health (NIH), National Science Fundation, Cardiology Institute of Texas din Statele Unite, Medical Research Council din Anglia, Australia și Noua Zeelandă ș.a. A fost membru a 13 Societăți Științifice internaționale, între care American Society for Cell Biology, American Thyroid Association, American Association for the Advancement of Science, International Society for Endocrinology, European Vascular Biology Association etc. și membru în mai multe colegii editoriale ale unor importante periodice străine (Thrombosis Research, Cell Differentiation, Endothelium, Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology ș.a.).

Ilustrativ pentru aspectele menționate este faptul că în "International Citation Index" - Washington, DC, SUA Acad. Maya și Nicolae Simionescu sunt autorii români cu citările cele mai frecvente în literatura internațională.

La activitatea cu caracter didactic, arătată anterior, trebuie menționate înființarea doctoratului de biologie celulară și conducerea unor remarcabile lucrări de doctorat. A susținut prelegeri de biologie celulară la peste 15 universități străine, printre care Columbia, New York; Harvard, Boston; University of California, Los Angeles; Mount Sinai, School of Medicine - New York, toate din SUA, precum și la alte universități din Japonia, Franța, Portugalia etc. A fost "Visiting Professor" și "Invited Lecturer" la peste 30 de instituții renumite de cercetare și învățământ din occident.

Perioada celor mai importante împliniri, de după 1970, a fost întreruptă brutal, neașteptat, extrem de dureros și ireparabil în dimineața zilei de 6 februarie 1995. Își asumase, în afara preocupărilor științifice și de conducere a Institutului de Biologie și Patologie Celulară, și responsabilități de mare semnificație pentru știința românească: era vicepreședinte al Academiei Române și al Academiei de Științe Medicale, președinte la Fundația Română pentru Știință, la Comitetul Național pentru Biologie Moleculară, la Societatea Națională de Biologie Celulară ș.a. Inițiase, concepuse și începuse derularea unui sistem de subvenționare prin grant-uri, menit să valorifice competența și competitivitatea în finanțarea cercetării științifice românești. Desfășura un volum enorm de muncă inteligentă, adeseori tensionată de rezistențele și inerțiile pe care le întâmpina. Conștiința faptului că avea priceperea și perseverența pentru importante îmbunătățiri ale desfășurării și conducerii cercetării științifice în România a fost suportul sufletesc pentru necruțătorul efort. Până când ...

Faptele, realizările, înșiruite incomplet și fără conotațiile emotive care să le dea căldură omenească, pot să contureze totuși, prin expresivitatea lor obiectivă, destinul și împlinirile celui care a fost profesorul Nicolae Simionescu.

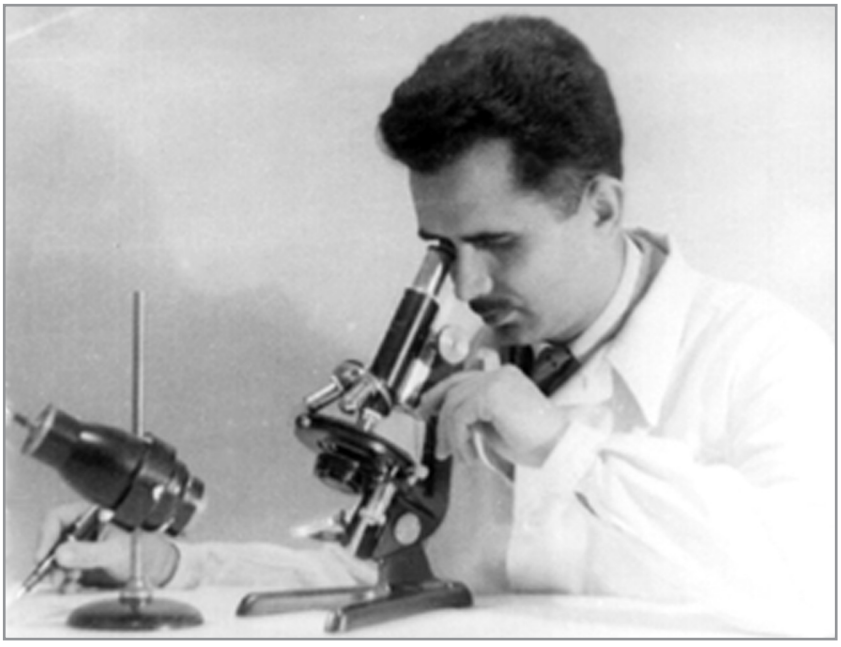
La acestea se impune menționarea unor detalii semnificative. Profesorul Nicolae Simionescu a păstrat în suflet o caldă afecțiune și a afirmat public recunoștința sa pentru maeștrii care i-au stimulat și îndrumat pasiunile și eforturile carierei științifice: profesorii Fr. Rainer, Gr.T. Popa, Șt. Milcu, G.E. Palade. Pilda maeștrilor și propriile resurse sufletești l-au determinat să fie generos ca dascăl, om de știință și întemeietor de instituții științifice.

A detestat ingratitudinea și afirmarea zgomotoasă a unui patriotism verbal; om al faptelor pozitive și al prețuirii valorilor reale umane și-a făcut cunoscută țara prin superioare performanțe științifice, înscriindu-se, în vremuri grele, în comunitatea aleasă a adevăraților patrioți și buni români.

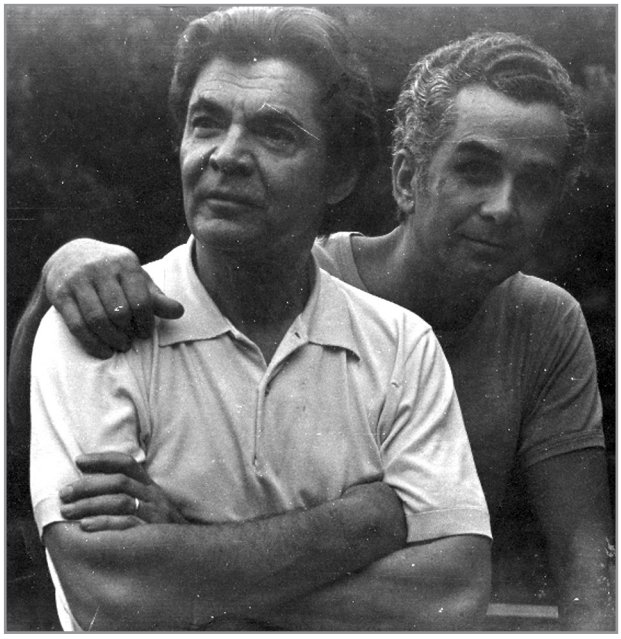
Cei care l-au cunoscut îndeaproape și i-au stat alături, păstrează în suflet amintirile despre un om inteligent, generos, curajos, răspândind în jur înțelegere omenească, grație sufletească, un farmec personal inimitabil și un superior simț al umorului. Toate la un loc au constituit o șansă, dar și obligația de a onora o prețioasă moștenire.

ALBUM
NICOLAE SIMIONESCU

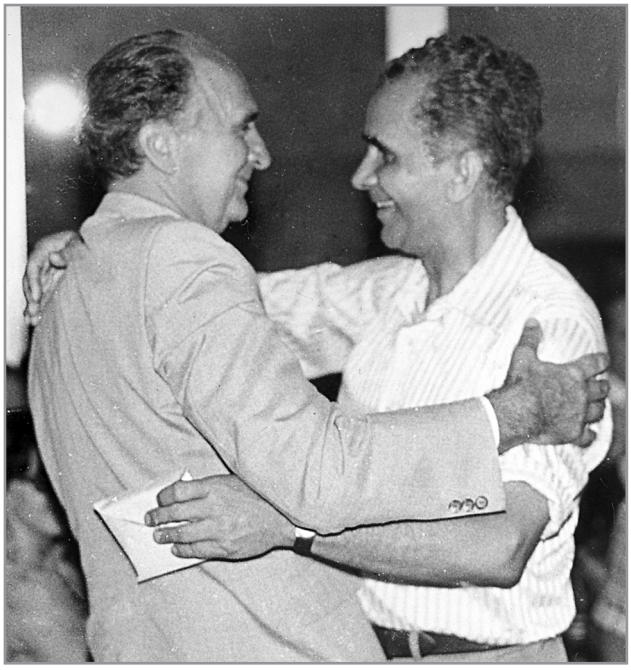
La catedra de Anatomie 1949



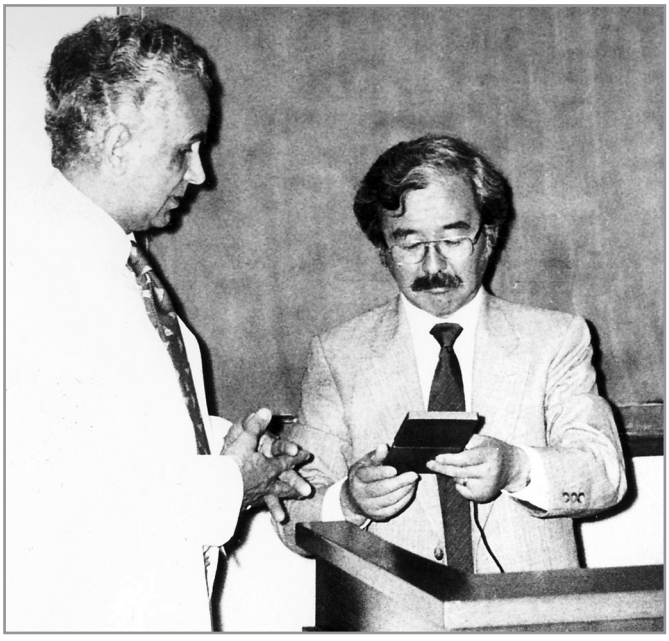
Chirurg la Clinica de Chirurgie a profesorului Ion Juvara 1950
... cu George Palade (New Haven) 1974



Acordarea premiului internațional "Louis and Arthur Lucian Award" de către Universitatea McGill, Montreal, Canada 1978



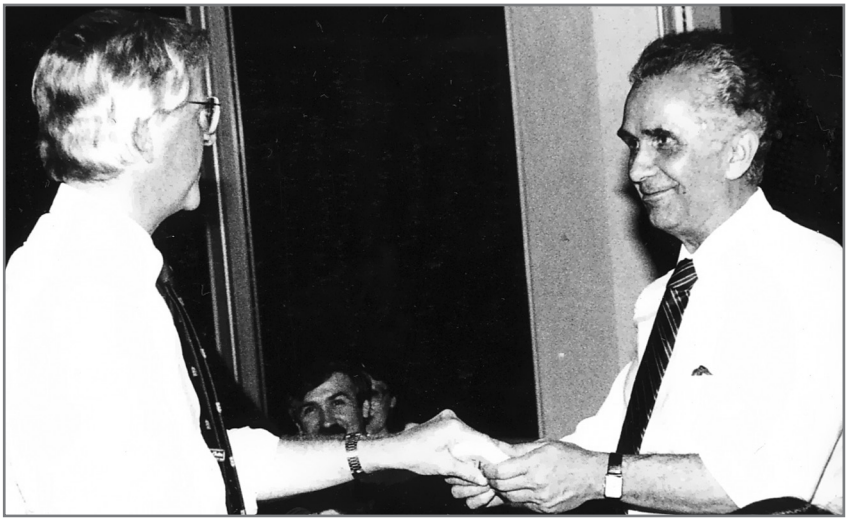
...cu profesorul Guido Majno
...cu profesorul Nakane

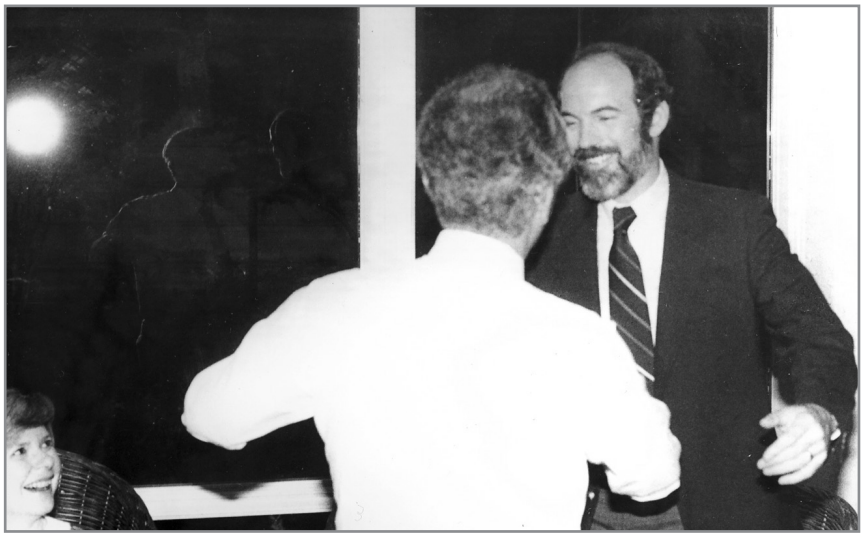


...cu profesorul Guido Majno
... cu profesorul Morris Karnovsky

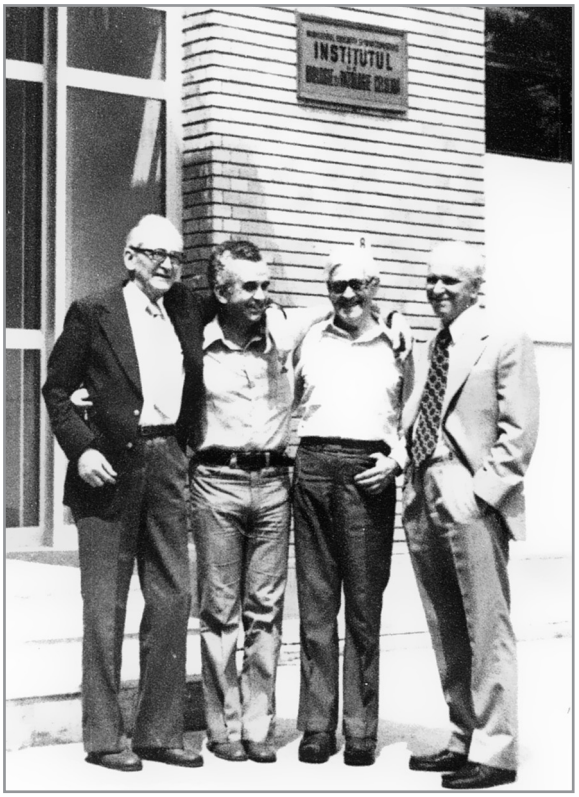
...cu profesorul Judah Folkman
...cu profesorul Gary Grotendorst

...cu profesorul Dan Steinberg
...cu profesorul James Jamieson



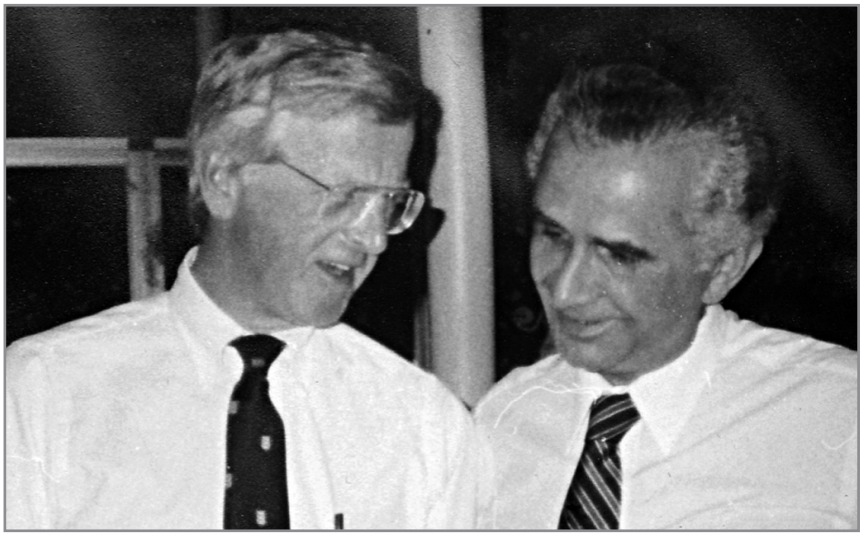


...cu profesorul Dick Anderson



...cu profesorii Ion Juvara, Gică Mănescu, Titel Vereanu

...cu profesorul Bob Wissler
...cu profesorul Sam Silverstein

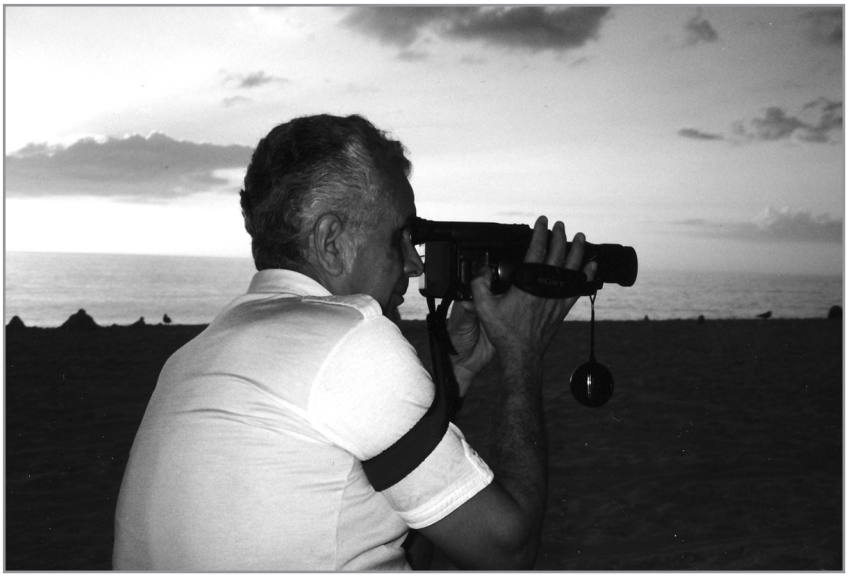


...cu profesorul Jim Jamierson
...cu profesorul Ramzi Cotran

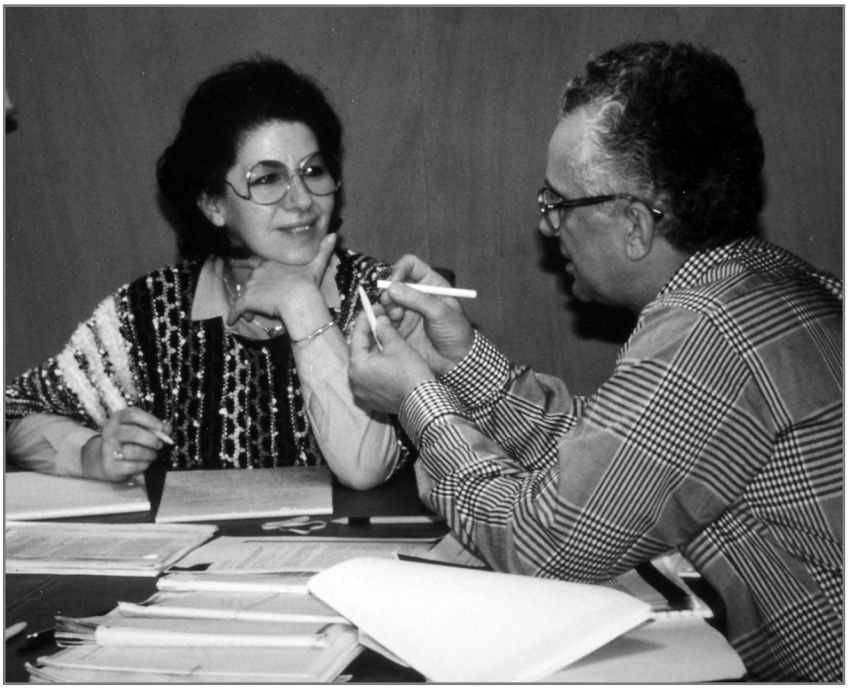
...cu profesorul Alan Fogelman
...cu profesorul Joe Witzum

...cu profesorul Nick Kefalides

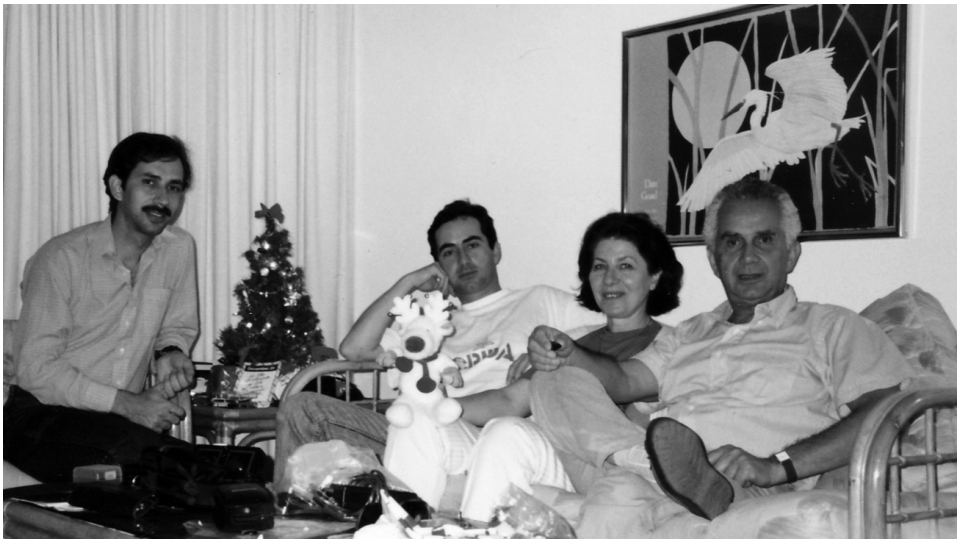
...cu noi



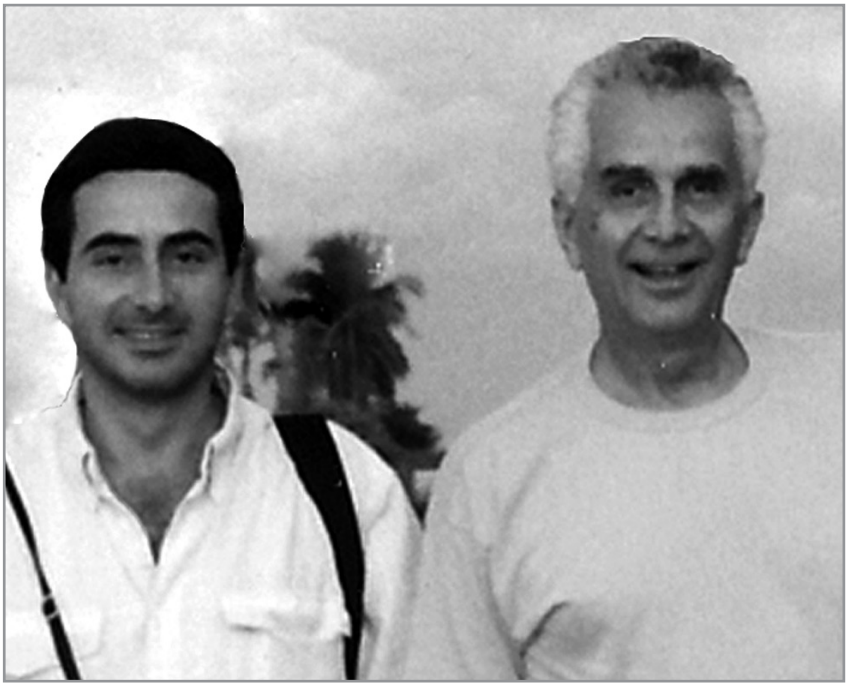
Albany 1978



...cu Vlad și Dan Simionescu la New York 1977



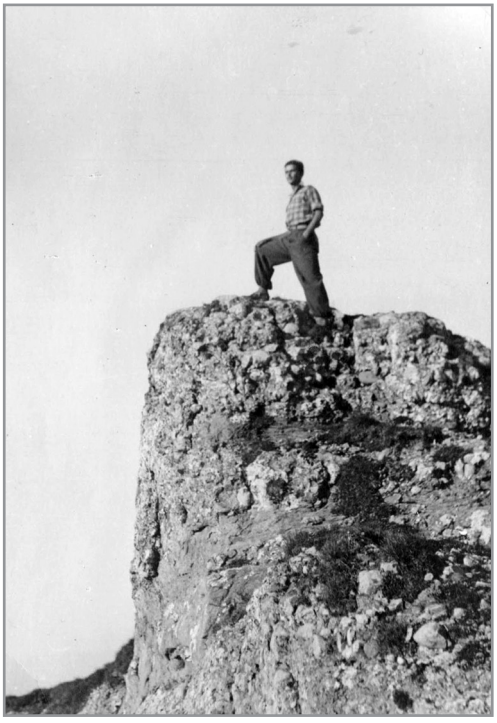
...Crăciun în familie



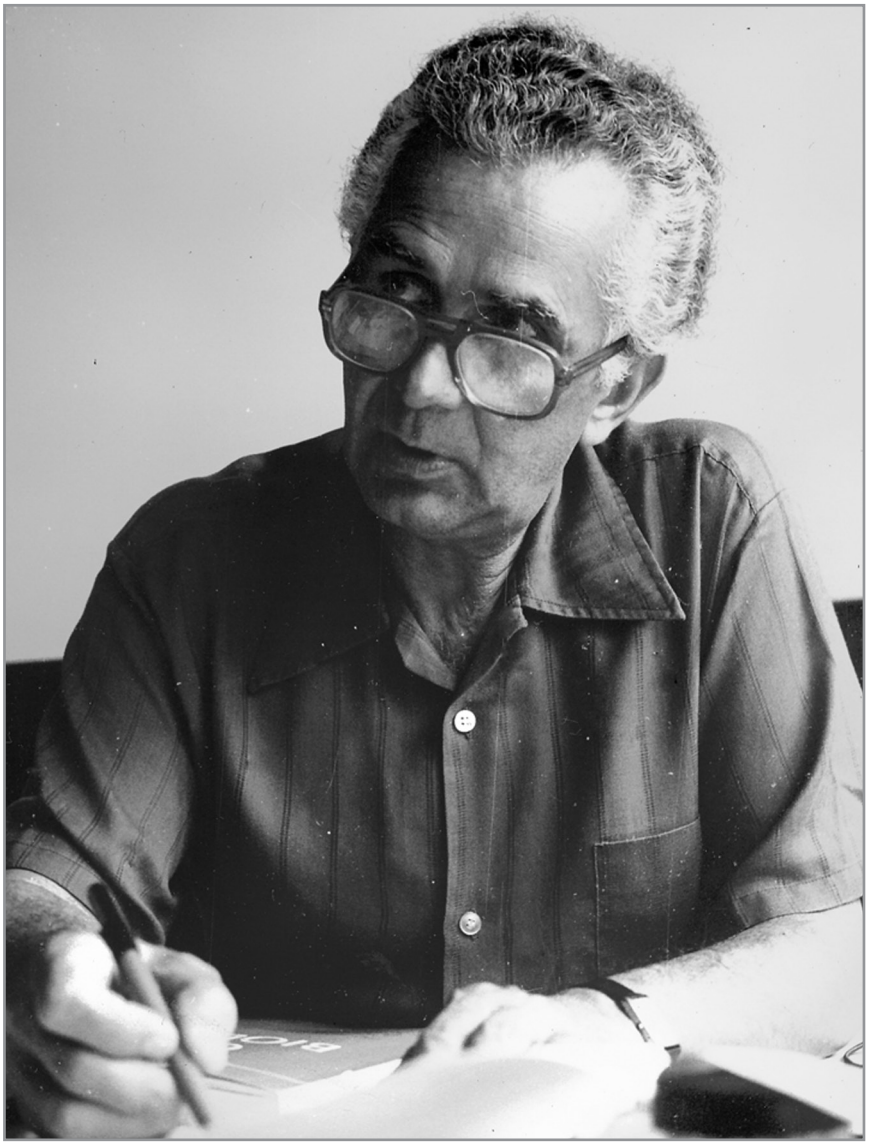
... cu Vlad
... cu Dan

...cu nepoata Adriana
...în familie 1992

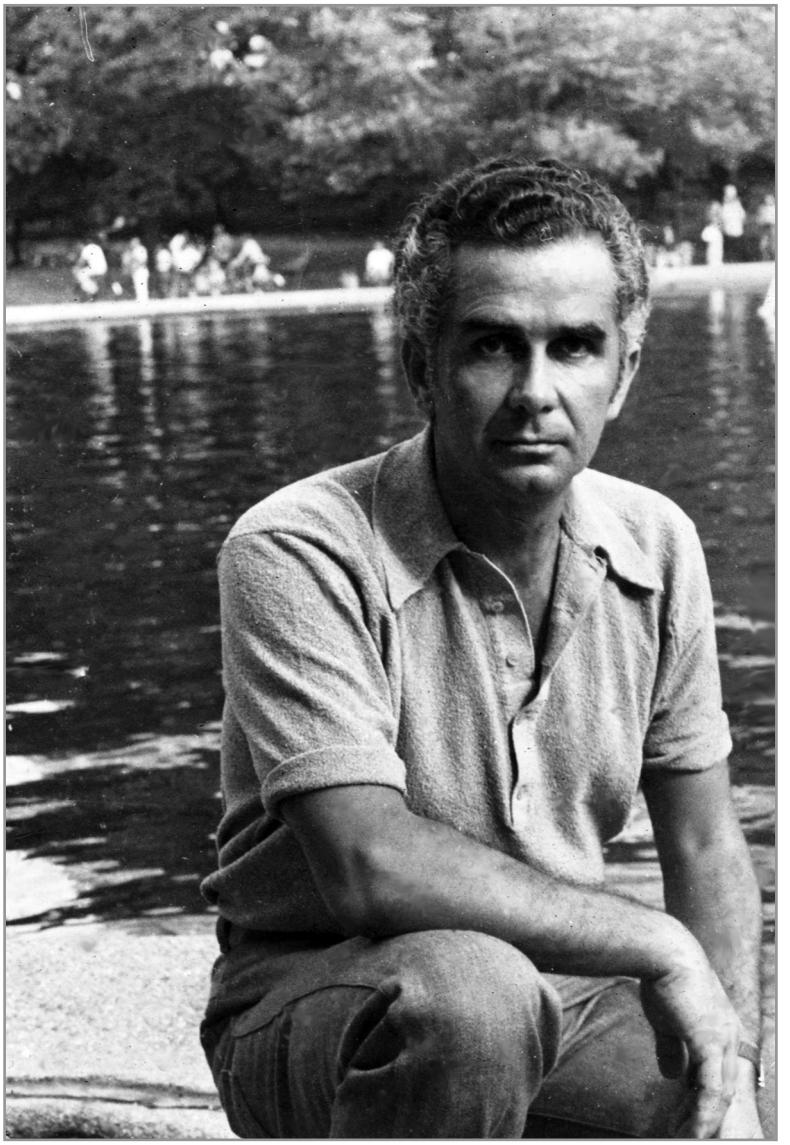
...cu băieții la școală
...la munte



Elevul Nicolae Simionescu 1940



București 1985



New York 1975

PRELEGERI ALE PROFESORULUI NICOLAE SIMIONESCU

MIHAI EMINESCU – UN SECOL DE NEMURIRE

ALOCUȚIUNE PREZENTATĂ CU OCAZIA COMEMORĂRII A 100 DE ANI DE LA DISPARIȚIA POETULUI IBPC, BUCURESTI, 25 IULIE 1989

Stimați Oaspeți, Stimați Colegi,

În primul rând, vreau să vă exprim întreaga gratitudine pentru prezența Dumneavoastră aici.

V-am invitat pentru ca împreună să creem și să împărțim momentele de încântare și meditație pe care le poate genera comemorarea unui unicat cultural de profunzimea și complexitatea "fenomenului Eminescu".

A comemora (a ne aminti împreună) pe Eminescu nu este numai un act de pietate și un câștig în înțelegerea valorilor culturale care definesc poporul român, ci și un prilej să reînvățăm a stima și a iubi valoarea. Când ne-am propus să-l comemorăm pe Mihai Eminescu, cineva m-a întrebat cu oarecare nedumerire, cam așa ***"Ce are Eminescu cu un institut de cercetare ?!"*** Dânsului nu am avut răgazul să-i explic, dar astăzi simt nevoia, și vă cer îngăduința să exprim unele gânduri despre ce rost are comemorarea lui Eminescu în Institutul nostru, gânduri care, de fapt, ating o problemă mai generală despre locul și rolul culturii în viața unui institut de cercetare. Un cunoscut profesor de biologie celulară și erudit istoric al cercetării experimentale, Frederick Grinnell definește astfel știința: ***"Știința reprezintă multe lucruri: este un mod de a gândi şi o activitate a unor indivizi în laborator, o instituție elaborat structurată care își recrutează și educă membrii, în esență este un segment sensibil, interactiv şi integrat al culturii şi societății moderne".***

De la conceperea lui, institutul nostru a fost gândit ca o instituție de cultură în care se lucrează știință. Această concepție avea la bază două idei general acceptate. Prima: știința este parte a culturii, iar a doua: cultura înseamnă deopotrivă trei lucruri: creație, asimilare și transmitere de valori. În fond, acest mod de a concepe un Institut, pune, la o scară foarte restrânsă, problema generală a rolului culturii în formarea unui om de știință.

Istoria Științei arată că un cercetător poate ajunge la o exprimare deplină a personalității lui creatoare, atunci când este sensibilizat prin cultură. Pe plan individual

este problema relației între creatorul de artă și receptorul (nu receptorul celular) om de știință. Orice receptor este un potențial creator, deoarece însăși asimilarea unei valori literare sau artistice poate conține componente ale unui act autonom de creație. Această fațetă a relației **cultură-știință**, dă un sens mai complex cunoscutului **Homo Cogitans - Homo Significans.**

Cu aceste idei în minte, iată-ne acum 10 ani, la începutul activității institutului, înconjurați de un grup de tineri - foarte tineri - deosebit de înzestrați și entuziaști. De la început, noi cei doi "seniori", am avut sentimentul responsabilității de a le asigura aici nu numai aparate, chimicale și cărți, ci și condiții pentru o formare complexă, în care să se îmbine armonios un înalt profesionalism cu o largă și nesaturată deschidere spre mesajele perene ale culturii. Această deschidere este însăși un element definitoriu al tinereții, pe care o formulează admirabil George Enescu în eseul intitulat ***"A fi tânăr": "Rămâi tânăr atâta vreme cât rămâi receptiv la tot ce este frumos, bun şi mare, la mesajele Naturii, Omului şi Infinitului".***

Și atunci, ca și acum, am fost profund convinși că, mai mult ca oricând, țara noastră are nevoie nu numai de buni tehnologi, ci și de creatori de știință sensibilizați și fertilizați prin cultură. Din astfel de oameni ies marii **patrioți.** În acei ani de început ai Institutului, fascinați și preocupați de aparate sofisticate și proiecte de cercetare, de rezultate noi sau eșecuri amărui, ne-a rămas relativ puțin timp pentru cultură. Totuși aproape zilnic, în orele de răgaz, se ascultă muzică clasică, se poate examina elaborata cartă a Istoriei Civilizației Universale (probabil unica în țară) în fața aforismelor lui Pasteur, Babeș, Einstein, alături de cele ale lui Brâncuși, Enescu sau Montaigne.

Ca biologi, am înțeles foarte bine că așa cum unele viețuitoare trăiesc în apă sau aer, omul trăiește în cultură, acel "ceva" dincolo de binele sau răul cotidian. Dar, tot ca biologi, ne-am dat seama că în lumea contemporană (deseori "o lume ca nelumea"), așa cum toate mediile naturale sunt poluate și cultura poate fi poluată. De aceea cred că este oportun să vorbim azi de o **ecologie a culturii** la care avem datoria de a participa activ pentru identificarea și combaterea surselor de poluare și a gravelor efecte pe care le pot avea asupra purității și viabilității moștenirii spirituale pe care o transmitem viitoarelor generații.

Acum, după un deceniu de activitate, Institutul și-a propus să treacă la o nouă etapă aceea a organizării și asimilării directe a unor acte de cultură. Prin asta nădăjduim să cultivăm în rândul titnretului nostru și cel de-al 3-lea parametru al culturii, anume responsabilitatea pentru transmiterea de valori, emanată din stima pentru valoare.

Pentru orice societate, inclusiv a noastră, progresul depinde de capacitatea de a forma "masa critică" de oameni demni, capabili și fermi să orânduiască natural scara valorilor, împotriva poluantei non-valori. O comunitate științifică care privește spre

viitor, inclusiv acest mic și modest institut, este vital interesată, nu atât în a redefini "lumea ca nelumea", și nici de a-i separa (așa cum spune Eminescu) pe "smintiți și pe mișei", ci în primul rând în a identifica, promova și ocroti acele realități care poartă în ele permanența spiritului și geniului creator al poporului nostru. Asta implică să urâm apatia și această comemorare este o luptă împotriva apatiei, pentru că - așa cum spunea un celebru gânditor: ***"Nepăsarea este treapta cea mai de jos a libertății".***

Iată ce rost are în Institutul nostru comemorarea lui Mihai Eminescu, acest "om deplin al culturii românești", cum îl numea Constantin Noica. Omul care, în numai 15 ani de creație, ne-a dăruit alături de o inegalabilă poezie, peste 14 000 de file de manuscris adunate în 44 de caiete. După opinia specialiștilor, acestea sunt comparabile poate doar cu caietele lui Leonardo da Vinci și Paul Valery, fiecare dintre ei beneficiind de aproape o jumătate de secol de creație. De ce sunt atât de importante pentru noi caietele lui Eminescu? Pentru că ele reflectă o imensă sete de cunoaștere pentru tot: filozofie, filologie, economie, istorie, etc. Și deși Eminescu nu și-a luat Doctoratul - caietele lui conțin zeci de pagini de adnotări de biologie, chimie, fizică, matematică. Comemorându-l pe Eminescu, reiterăm îndemnul, adresat îndeosebi tineretului nostru, pentru încredere în geniul creator al poporului român și năzuința activă spre o formare complexă.

Nevoia țării noastre de așa ceva este admirabil exprimată de Nicolae Iorga care definea astfel pe Eminescu și societatea din vremea lui: citez, și cu aceasta închei: ***"Un om complet, într-o vreme în care ceea ce este cel mai necesar pentru noi este această refacere a omului complet, pe care timpurile noastre l-au sfărâmat în fragmente, distrugând omenirea în însăşi esența ei inițială şi definitivă".***

"THE CELL, A WISDOM IN IDENTITY AND INTEGRATION" NICOLAE SIMIONESCU AND MAYA SIMIONESCU

ALOCUȚIUNE ȚINUTĂ LA SIMPOZIONUL INAUGURAL DE DESCHIDERE „BIBLIOTECA UNIVERSALIS", SZENTES – UNGARIA, APRILIE 1994

CONFERENȚIARII INVITAȚI:
Dr. Arpad Goncz, President of Hungary,
Mr. Ronald M. Blinken, Ambassador of USA in Budapest,
Dr. Lajos Koncz, Founder and director of Harvard Circle,
Dr. Jozsef Sz.-Rebeli, Mayor of Szentes,
Prof. Dr. K.D. Rainsford, Sheffield, England,
Dr. Maya Simionescu, ICBP, Romania,
Dr. Nicolae Simionescu, ICBP, Romania,
Dr. Sandor Szabo, President of Bibliotheca Universalis Foundation.

Mr. President,
Mr. Chairman,
Ladies and Gentleman,

Professor Maya Simionescu and I want to thank you for the privilege to participate in this outstanding symposium held with the occasion of the inauguration of this impressive achievement which is going to be Bibliotheca Universalis.
I am a cell biologist. As a perpetual student, I am humbly trying to understand a little bit about the marvelous organization of human body. During these attempts, I found that we know very little about human body cells. This is why, I am not going to tell you something on this topic. What I am going to speak about is something that I learned while watching the cells of living organisms, including humans, something very precious for my way of thinking as a citizen of this Continent.
I learned that during their billion years of evolution, by very simple means, the cells succeeded to accomplish what human population is striving to achieve: to survive, to propagate and to evolve.
It seems that, these fundamental units of life, the cells, facing the growing harassment of the environment, became wiser and wiser in finding ways to accommodate apparently opposite entities (encountered in any living community, including Europe) namely,

the harmony between unity and diversity
between identity and cooperation
between identity and integration.

With your permission, let me try to reveal some examples that might tell Homo Sapiens and Homo Europaeus, including Homo of this still unsettle part of Europe, that while the humans are seeking for intellectual mastery over Nature, they should listen and learn from the Nature's lessons. Allow me to give you some examples on which I build up this way of thinking.

The unity of life. The hierarchy of organization of the matter in nature, it's spanning on an unbroken line that begins in the world of elementary particles and ascends progressively through more elaborated structures which contains the previous level. At each level new properties emerge: the whole is more than the sum of its parts (Fig. 1).

THE HIERARCHY OF ORGANIZATION IN NATURE
- Emerging new properties at the sum of parts -

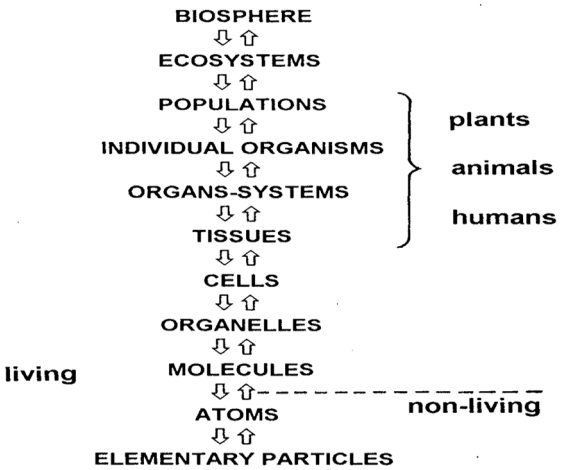


Fig. 1

The line starts with the elementary particles that form atoms, molecules, organelles, cells, the cells get organized in tissues, tissues in organs, organs in individual organisms that are organized in populations, which interact with the ecosystems that belong to the biosphere.

While the non-living matter stops at the level of the molecules, the living organisms contain all these common components and as the first lesson we should be reminded that we are build up on common components and we inherit the same heritage which is transmitted from one level to another of the organized matter. Starting with cells assembled in tissues, organs and organisms, and populations, we entered the realm of plants, animals and humans.

Because of the common components and of the universal heritage, there is a striking unity and simplicity in the molecular and cellular organization of the living matter.

The cellular basis of life. The cell is the fundamental unit of life, the smallest self-contained and self-reproducing structure. This cellular basis of life is believed to descend from an "archeotype" cell that, during the evolution and selection, was able to preserve its replication system. Upon interaction with the external medium, the cell continues to exchange matter and energy across a semi-permeable barrier: the cell membrane. This enables the cell to grow continuously from one generation to another by duplication and adaptation to the surrounding medium; that was the key of the continuity of living matter. That is why we define the cell as the fundamental unit of life, as being the smallest self-contained and self-reproducing unit (Fig. 2).

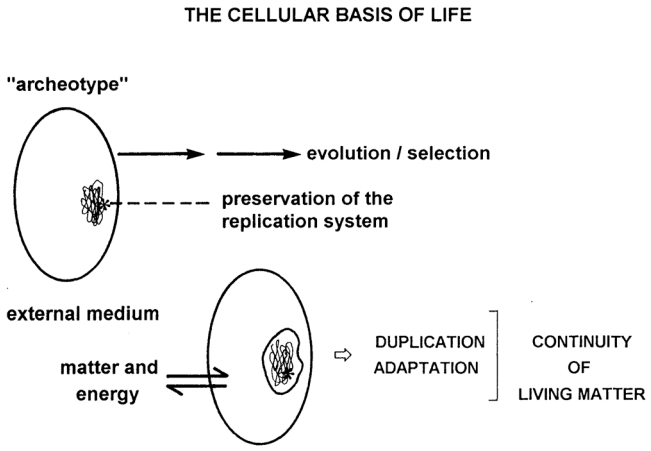


Fig. 2

When we look at the cell evolution and we take again the pathway from the common ancestor and the selection by evolution results that all eukaryotic cells, including the cells of the human body, have the same genetic material. But, what is very special is that this genetic material is only partially expressed in one cell or another, and this generates different cell type.

What we learn from this is that we all have the same genetic material, but under the influence of different intracellular or extracellular regulating factors, only some of this inherited material is expressed and this generates different type of cells. Just to give you an idea: when this genetic material, which is deoxyribonucleic acid, is expressing a certain gene, a special type of cell will be formed. When another gene is expressed, another type of cell will differentiate. Thus, quantitative and qualitative differences in the gene expression will generate cells specialized in transport, or in secretion or in contraction (Fig. 3).

I want to give you a figure which is just a coincidence. In the human body there are about 200 types of specialized cells. The number of the countries which belong directly

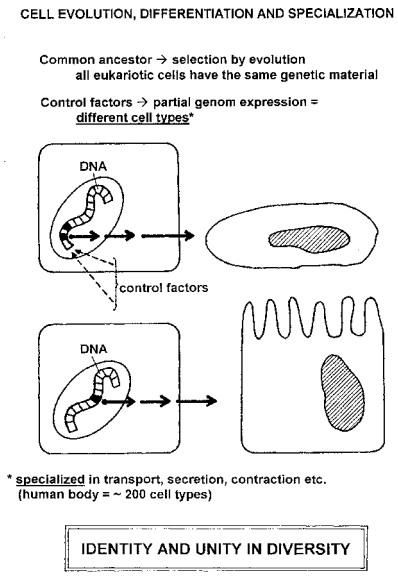


Fig. 3

or indirectly to the United Nations is again, about 200. It is just a coincidence…
What we can learn from these data is that, in the staggering diversity of cells, the identity and the unity of cells is maintained, and the cells manage to harmonize the identity, with unity and diversity.
Going further during the evolution, we learned that behind this diversity and complexity of the living organisms, there is a unity and simplicity in their molecular and cellular makeup, because all cells are buildup from the same material and all of them have inherited the same genetic material. Then, to be a cell one needs a memory tape which is the genetic information represented by the special molecule, DNA, and this molecule contains all the instructions for the replication of the cell and for the synthesis of cell components and products. To be a cell there is a need for a surrounding semi-permeable boundary which controls the exchanges and communication of the cell with other cell and the external medium, and there is a need for an energy generating system (Fig. 4).
We can look at the cell like being half way between the elementary particles (as shown in the first slide) and the biosphere. Also the cell can be considered as representing the whole universe reduced to its essence.
Specialized cells cooperate and build up tissues and organs. There are cells specialized in transport like for instance cells that line the intestine that have close cell to cell contacts securing the attachment of these cells between themselves; this is the epithelium. But in addition to that, in the intestine for the contraction, there are muscle cells (that form muscle tissue), connective tissue in which all these cells are embedded, extracellular matrix, and other types of cells like macrophages which are specialized in ingesting bacteria or things like that. They all form the organ. But in an organ, which it's made up by several tissues, each of them is maintaining its identity

as structure, its identity as function, but they cooperate, and what is crucial, because of this cooperation, the whole organ has richer capabilities that any of its parts (Fig. 5).

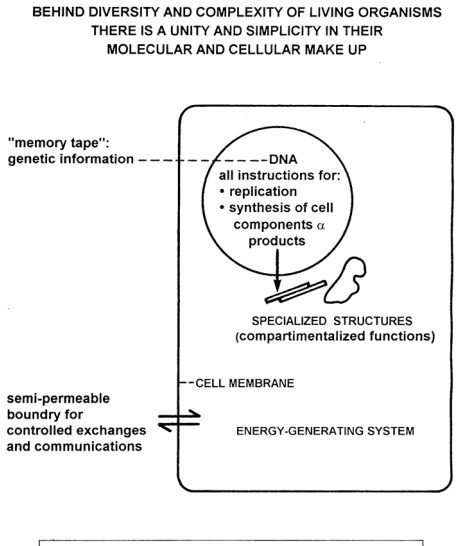


Fig. 4

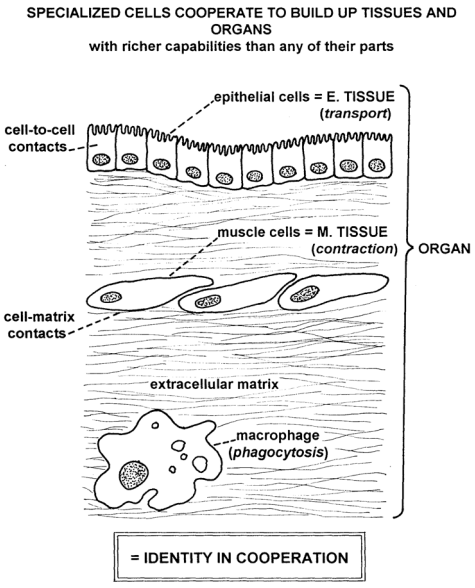


Fig. 5

Than if we want to be richer, and if we want to be more effective we have to cooperate, and while cooperating we should not be afraid about loosing identity.
There is a continuous two ways flow of matter and energy through the cell. Cells don't function isolated; through their plasma membrane some molecules (small molecules) are transported passively or actively, some other molecules are taken up and ingested, by endocytosis, some are transported across the cell by transcytosis, while some products of the cells are exported. Thus, cells and especially their plasma membrane are actively involved in import, transport and export; there is a continuous exchange of materials between the surrounding medium and the cells (Fig. 6).

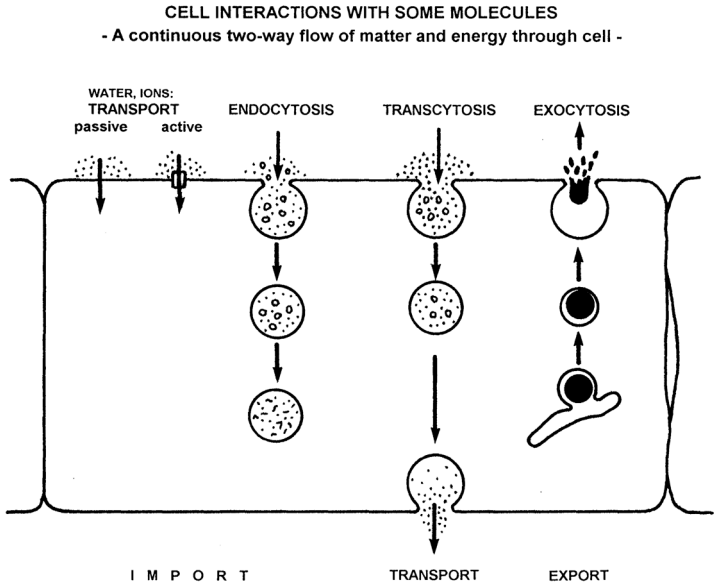
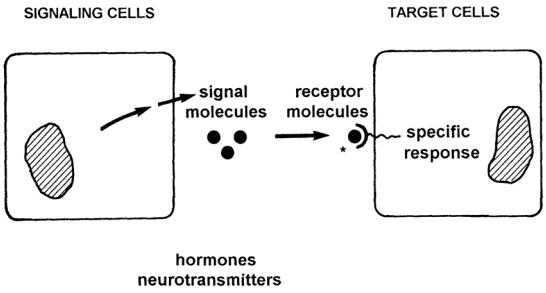


Fig. 6

Probably one of the most important ways to reach cooperation and integration is to establish communications. The general pattern of cellular integration by communication is a simple one. Usually one cell, which is the signaling cell, is secreting a signal molecule that is recognized by a receptor molecule of another cell, the target cell; this is the case of hormones and neurotransmitters (Fig. 7).
But, what is very important during this type of communication, is that the molecules never invade the cell privacy; the interaction takes place at the cell surface and triggers the interaction with host cells. Therefore, during communication there is plenty of room for keeping the cell's identity.

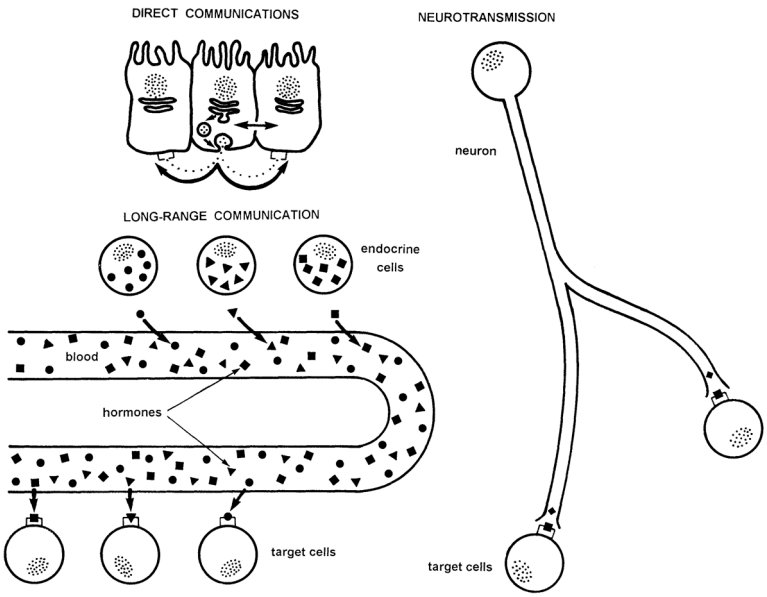
GENERAL PATTERN OF
TISSUES AND ORGANS INTEGRATION BY CELL COMMUNICATION



IDENTITY IN COMMUNICATION

Fig. 7

Fig. 8



Above (Fig. 8) there are some examples of cell communication: direct communication between cells or long range communication by hormones secreted by the endocrine cells in the blood, and from the blood they reach the target cells, or the transmission of the nervous impulse from the neurons to the target cells. On the whole there are long range and short range communication.
On a larger scale, cell and organs can be compared with modern cities and countries, in which there is a division of labor fulfilled by specialized compartments and services. By communication one achieves integration which is a prerequisite for building and maintaining an organism.
Sometimes organs and cells are assaulted by foreign invaders. To escape from an invader you need strong cells which can communicate and integrate to reach the same goals. Sometimes, the invaders last a little longer, sometimes the invasion is shorter. The overall idea is that to get off or prevent invaders, we should bear in mind that there are some others organisms that can help us, because we belong to the same environment, we belong to the common house we live in, which is made of the biotic communities and the ecosystems. Because actually, literarily speaking, ecology means the "study of the house".
Looking behind while thinking forward allow me to conclude by saying that the human being is a Society of cells, and that the human being is not only a maker and a builder, but also a learner (Fig.9).

INSTEAD OF CONCLUSION

a look behind thinking onward

Human being = a Society of Cells
a maker, a builder,
but also a learner:

Homo Europeus should learn from the wisdom
of its own cells
which, along millions of years, have proved
that they could not only survive but
also evolve, by harmonizing

IDENTITY WITH DIVERSITY
IDENTITY WITH COOPERATION
IDENTITY WITH INTEGRATION

Fig. 9

Homo Europeus, especially during this period when our continent is still not very well settled, should learn from the wisdom of its own cells, which along million of years have proved that they could not only survive but also evolve, by harmonizing: identity with diversity, identity with cooperation, and identity with integration.
Thank you for your attention.

PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU ÎN INTERVIU CU DOMNUL

NICOLAE TZONE

PROF. NICOLAE SIMIONESCU
ÎN INTERVIU CU DOMNUL NICOLAE TZONE
- APRILIE 1993 -

AMINTIRI DIN PERIOADA SUA ,
DESPRE GEORGE E. PALADE,
DESPRE CUM S-A NĂSCUT IDEEA INSTITUTULUI

Nicolae Tzone (NT) - D-le profesor, am ales pentru debutul dialogului nostru, cu speranta ca vă va face plăcere, un scurt fragment dintr-un amplu articol ce v-a fost dedicat, dv. și d-nei Maya Simionescu, foarte de curând, în revista Curierul Românesc. Autorul acestuia, dl. Ion Longin Popescu, își încheia pledoaria cu propozițiile care urmează și pe care am ținut neapărat să vi le reamintesc: "...dacă George Emil Palade nu ar fi primit Premiul Nobel pentru descoperirea granulelor care sintetizează proteinele, baza vieții, atunci marele savant, fără exagerare, ar fi trebuit să-l primească pentru descoperirea profesorilor Nicolae și Maya Simionescu ".

Nicolae Simionescu (NS) - Bine, dar aici este vorba de o metaforă ziaristică... Am, desigur, toată stima pentru dl. Longin Popescu, care e un foarte bun ziarist, dar cuvintele pe care abia le-ați reprodus reprezintă, evident, o exagerare.

NT - Cum l-ați cunoscut pe profesorul Palade ?

NS - Cred că aceasta se întâmpla prin 1968. Dacă îmi aduc bine aminte, profesorul Palade făcea parte dintr-o delegație a Academiei de Științe a SUA și se întorcea în țară, pentru prima oară, dupa foarte mulți ani. Da, erau 20 și ceva de ani de când plecase din România. În esență, profesorul a vizitat atunci mai multe institute de cercetare, a mers în câteva universități, a purtat, alături de membrii echipei cu care sosise, discuții cu persoane din conducerea Academiei Române. Între aceste vizite s-a situat și venirea sa la Institutul de Endocrinologie, unde lucram împreună cu Maya Simionescu. A stat cu noi în laborator aproximativ trei sferturi de oră, i-am arătat ceea ce lucram. Asa cum îl știm, profesorul Palade nu e un om care vorbește foarte multe, în special la primele lui reacții. Pot, deci, spune, ca întâlnirea de la acea dată n-a avut nimic extraordinar în desfășurarea sa. Noi i-am arătat ceea ce realizasem în studiul patologiei endocrine într-o prima fază de cercetare, în care introdusesem și metode de o performanță mai bună, cum era microscopia electronică ori citochimia, dar, repet, discuțiile, câte au fost, nu au depășit stadiul unei vizite protocolare.

NT - Putem fixa acum apariția ideii viitoarei colaborări cu dv.? Putem vorbi deja de prefigurarea realizării viitorului Institut de Biologie și Patologie Celulară în România ?

NS - Sunt convins și eu că profesorul Palade a înțeles, în mod sincer, să stabilească o legatură între laboratorul lui și laboratoare din România, dar încă nu putem vorbi, la aceasta dată, de ceva concret în acest sens. Nici nu se putea, de altfel, discuta serios despre o colaborare între un laborator care era în vârful piramidei științifice mondiale și oricare alt laborator din România, unde, practic, nu exista ceea ce constituia domeniul de predilecție al activității sale, biologia celulară. Nu poți face colaborare între unități disimilare din toate punctele de vedere.
Eu vă spun faptele, fără a le greva de romantism. Pe tot parcursul acelei prime întâlniri, a mea și a Mayei, cu profesorul Palade, n-a fost vorba nici măcar o singură secundă de o viitoare colaborare.

"A, VĂ DUCEȚI SĂ LUCRAȚI PENTRU ARMATA AMERICANĂ..."

NT - Ce s-a întâmplat mai departe ?

NS - Nu mică ne-a fost surpriza, anul următor, în 1969, când am primit invitația de a lucra cu dânsul la Universitatea Rockefeller, pe o perioadă de doi ani. Era, deci, vorba nu de o cooperare cu România, ci de dorința de a avea între oamenii din laboratorul său și doi români.
Numai că în paralel cu această invitație primisem și o alta, de la profesorul Gunter Barr, de la Institutul de Patologie al Spitalului Walter Read din Washington. În 1968 fusesem trimis de Uniunea Internațională contra Cancerului în trei mari centre care studiau cancerul tiroidian. Eu făceam parte dintr-un grup care examina anual la Bruxelles, la Institutul Jules Bordet, cazurile mai speciale de cancer tiroidian, ceea ce mi-a oferit prilejul câțiva ani de zile să interacționez cu experți în această problemă a cancerului tiroidian, din Europa. A fost o activitate extraordinar de interesantă și de instructivă pentru mine. În 1968 grupul european m-a trimis în SUA pentru a discuta cu experții de acolo, cu scopul de a ajunge la câteva puncte de vedere com¬une privind felul în care trebuiau diagnosticate cazurile grele, cazurile limită de cancer. Șederea, atunci, la Institutul de Patologie din Washington, a adus prin urmare, invitația pe care am amintit-o deja. Eram, practic, chemat să lucrez ca specialist în cancerul tiroidian câțiva ani de zile la Spitalul Walter Read, unde funcționa respectivul institut. Era vorba de un spital de elită, unde fuseseră operați președinții SUA, cu cadre medicale de primul rang.
Deci, în 1969, am avut aceste două invitații. Și nu ezit să vă mărturisesc că prima mea tendință, dincolo de ideea fascinantă de a putea fi alături de profesorul Palade, a fost să merg la Walter Read. Toată activitatea mea din ultimii ani fusese orientată spre patologie, aveam deja o oarecare poziție între specialiștii în domeniu și credeam că trebuie se continui în această direcție. Voiam să folosesc această cale pentru că timp de 20 de ani studiasem cancerul tiroidian la Institutul de Endocrinologie. Aveam în urmă o mulțime de lucrări, între care și o carte care chiar atunci, în 1969, a fost

tradusă în limba engleză și cerută pentru publicare de către editurile Haineman din Londra și Academic Press din SUA.

NT - Totuși, ați dat curs, până la urma invitației venite din partea profesorului Palade.

NS - Când am făcut cererea respectivă la Ministerul Sănătății, deoarece pe antetul invitației sosite de la Walter Read, care era un fel de echivalent al Spitalului Militar de la noi, figurau și cuvintele "US ARMY", au început întrebările. „A, vă duceti să lucrați pentru Armata americană...", mi s-a zis. În fine, nu mi s-a aprobat plecarea. Atunci am venit și cu invitația de la profesor, spunând ca aș putea se stau un an la Institutul de Patologie și un an la Rockefeller. "Negocierile", dacă le pot numi astfel, cu Ministerul Sănătății, au durat mai bine de o jumătate de an. Mi s-a dat voie, în cele din urmă să merg la profesorul Palade, acordându-mi-se viză numai pe o perioadă limitată de timp, prelungirea acesteia constituind, în fiecare an, o veritabilă bătălie cu autoritățile.

NT - Mai păstrați invitația pe care v-a trimis-o profesorul ?

NS - Da. Cred că da. În orice caz, obtinerea vizei a fost un pas foarte greu de făcut. A contat atunci enorm ajutorul dat de profesorul Burghele, care, pe de o parte, îl cunoștea și-l prețuia mult pe profesorul Palade, și, pe de altă parte, mă cunoștea și pe mine.

NT - Dl. George Emil Palade, de altminteri, în niste crâmpeie de amintiri, vorbește foarte frumos despre profesorul Burghele.

NS - Pe bună dreptate. A fost un om remarcabil. Știu că există păreri împărțite în privința sa. Știu că multi nu i-au putut ierta anumite particularități, dar, în totalitate, a fost unul dintre oamenii deosebiți pe care i-am întâlnit în deceniile trecute. Pot să vă spun că profesorul Burghele a avut un rol pozitiv, hotărâtor chiar, în câștigarea interesului autorităților române pentru înființarea Institutului de Biologie și Patologie Celulară.

"INSTITUTUL ROCKEFELLER ESTE UN LOC UNIC IN LUME, DIN TOATE PUNCTELE DE VEDERE"

NT - Ați plecat, așadar, la profesorul Palade, în 1970...

NS - Da, în 1970 am plecat în SUA. Mai întâi doar eu, pentru că nu au vrut să ne lase să plecăm împreună. Așa că abia peste câteva luni, după intervenții repetate ale profesorului, a putut să mă urmeze și Maya, care lucra în același domeniu. Ea a primit aprobarea pentru a sta în SUA numai un număr foarte mic de luni, urmând ca

la sfârșitul anului să revină în țară. Și, într-adevăr, la termenul respectiv, a sosit hârtie de la București ca Maya Simionescu să plece acasă. Abia acum îmi dau seama cât de cuminți și de inconștienți am fost amândoi. Adică, intelegeți, eram somați să ne întoarcem și noi am fi putut pur și simplu să ne vedem de destinul nostru științific, adică să ignorăm adresele sosite. Dar noi, nu, ca niste copii foarte cuminți, foarte ascultători, am spus "Gata. Ne despărțim din nou" și am pregătit bagajele Mayei pentru plecare. Era, într-adevăr, o demență să pleci din condițiile de acolo și să revii la București, pentru că așa a spus nu știu cine de la serviciul de cadre al ministerului. Abia în ultima clipă, iarăși datorită intervențiilor profesorului, Mayei i s-a permis să ramână să lucrăm mai departe împreună.

NT - Să zăbovim asupra sosirii efective în SUA...

NS - Am ajuns aici în februarie 1970 și am intrat în departamentul pe care-l conducea profesorul la Rockefeller. Așa cum se știe, Universitatea Rockefeller este un loc unic în lume din toate punctele de vedere și nu puteai să nu fii mindru, ca român, văzând cât de prețuit era George Emil Palade. În câteva luni, cum am afirmat deja, s-a adăugat și Maya echipei noastre, începând o colaborare care a fost deosebit de fructuoasă pe plan științific și foarte reconfortantă pe plan uman. Interrelația cu un om ca Palade a fost, din toate punctele de vedere, hotărâtoare pentru evoluția noastră ulterioară. Am lucrat la Rockefeller, în departamentul său, 4 ani, din 1970 până în 1973, inclusiv.

NT - "Echipa Palade" era mare ?

NS - Departamentul condus de profesor avea o echipă formată din mai multe grupuri, unele dintre ele având chiar o oarecare independență. În orice caz, el era incontestabilul șef al nucleului. Era, repet, foarte apreciat, foarte respectat. De altminteri, din grupul respectiv au făcut parte oameni care ulterior au fost inserați printre vârfurile mișcării internationale în biologia celulară, cum sunt : Sabatini, Blobel, Tashiro, Luck s.a. Au fost, personalități care ulterior au devenit ele însele staruri, valori de necontestat. De altfel, aceasta este una dintre particularitățile extrem de evidente ale influenței benefice pe care profesorul Palade a avut-o asupra colaboratorilor lui. Chiar neștiind foarte mult la început în domeniu, după doi sau trei ani maxi¬mum, petrecuți în departamentul lui, acumulările deveneau perspective enorme.
Nu aș putea să vă spun foarte exact din ce motive anume colaborarea noastra, a mea și a Mayei, cu el a durat neobișnuit de mult, mai mult decât cu oricare dintre ceilalți "elevi" și, deopotrivă, colaboratori ai săi. Ne-am acomodat foarte repede, ne-am simțit foarte bine aflându-ne în permanență în preajma sa, sentimentul care ne anima find reciproc. Când profesorul s-a mutat de la Rockefeller la Yale, am mers împreună cu el, rămânându-i alături încă 6 ani de zile.
Așadar, colaborarea noastră, extrem de strânsă, a durat, din variate motive, subiective și obiective, neobișnuit de mult. Zece ani în totalitate. Ne-am acomodat excelent în

permanență. Ne-am simțt foarte bine împreună și am certitudinea că sentimentele care ne-au unit au fost reciproce. Ne-au legat o cantitate și o adâncime de investigație și de lucru deosebit de puternice.
Deși ne-am reîntors în țară am rămas în cele mai bune relații de colaborare. Am revenit, practic, cu regularitate în SUA, atât eu, cât și Maya, ca Visiting Profesor la Yale. Păstrându-ne poziția aici, în ultimii trei ani am funcționat și la Universitatea Columbia, unde am primit o numire mai specială, de Distinguished Visiting Profesor.

"LUCRAM NU NUMAI ALĂTURI DE PALADE, CARE ERA MAGISTRAL ÎN TOT CEEA CE FĂCEA, DAR ȘI ALĂTURI DE ALȚI CERCETĂTORI, DEASEMENEA DEOSEBIȚI".

NT - D-le profesor Simionescu, să revenim și să insistăm asupra amintirilor pe care le aveți din perioada Rockfeller ...

NS - Da, perioada Rockfeller... A fost absolut unică. Locuiam în una din casele de oaspeți ale universității. Eram, în fine, atât de uimiți de ideea de a fi parte dintr-un anumit mediu intelectual și parte dintr-un anumit anturaj tehnologic încât, acum, când citim sau ne aducem aminte de epoca respectivă, aproape că ne pare un vis că vreme de doi ani de zile am ieșit numai patru duminici din laborator. Dar campusul Rockefeller era cu total special. Acolo aveai de toate: o sală de spectacole superbă, unde se dădeau săptămânal concerte; o bibliotecă imensă de circa două milioane de volume, care aproape că îți poruncea să te cufunzi în lecturi nesfârșite. Aveau loc în permanență conferințe pe cele mai variate teme, extraordinar de interesante. Partea alimentară nu era, de asemenea, o problemă: cofetărie, restaurant de bună calitate. Tot ceea ce înseamnă bunăstare, liniște, civilizație era cu prisosință asigurat. Și, bineînțeles, deasupra la toate, un laborator cum numai cu gândul, numai cu închipuirea îl puteai visa. Un laborator excepțional în care se lucra fără normă, fără nici un fel de constrângeri în sfera de cercetare. Lucram, apoi, nu numai alături de Palade, care era magistral în tot ceea ce făcea, dar și alături de niște oameni deosebiți, cu care și astăzi suntem strâns legați, numărându-se printre prietenii noștrii cei mai apropiați. Fiecare dintre ei a devenit fie șeful unui departament, fie șeful unei școli de biologie celulară în țara sa: în Italia, în Japonia etc. Toți ne-am nutrit de acolo. Toți am fost sprijiniți și îndrumați de profesorul Palade. Toți ne putem considera privilegiați, având șansa de a fi, în ultima instanță, un produs al școlii respective, dominată de personalități ca Palade. Totodată, alături de influența profesorului, am simțit foarte mult influența ambianței generale.
Exemplul pe care vi-l dau in acest sens este, cred, deosebit de concludent: în blocul de laboratoare în care lucram noi, la momentul acela erau cinci laureați ai Premiului Nobel. Da, într-un loc cât jumătate din institutul nostru de aici, din București, lucrau cinci laureați Nobel. Vă dați seama?

NT - Profesorul Palade avea, înțelegem, un anume fel de a fi, de a prețui, de a pune bazele unei colaborări și de a o continua...

NS - Desigur. Impunea prin prezența sa și, în genere, prin tot ceea ce făcea. Era un om exigent cu sine, în primul rând, dar era exigent și cu ceilalți. Și totuși, dincolo de această exigență, impusă, de altminteri, de o activitate științifică de amploare, simțeai, în permanență, că trăiești lângă un om care te respectă. Care-ți respectă punctul de vedere. Care ți-l acceptă dacă-l probezi. Era deschis totdeauna la interreacții. Pe măsură ce ne-am cunoscut mai bine, lucrurile s-au relaxat din toate punctele de vedere. Iar faptul că am reușit să producem, în anii aceia, să spunem, lucruri rezonabile, importante în plan științific, se datorează și imprejurării că ne-am regăsit trei personalități care ne-am completat foarte armonios - sigur, fiecare la dimensiunile și la nivelul său. Palade venea cu o mare experiență de lucru, cu o mare autoritate, iar noi aveam de partea noastră fantezia vârstei, dorința extraordinară de a participa la nașterea unor descoperiri științifice impresionante. Deci am introdus împreună o serie de metode, o serie de date și descoperiri care au rămas în literatura de specialitate.

NT - Cum a decurs activitatea la Yale?

NS - Aici, atât Palade, cât și soția sa, Marilyn Farquart, au capătat funcțiile de Full Professor. În ce mă privește pe mine și pe Maya, mutarea în această universitate a constituit prilejul - pe care nu l-am căutat, dar așa s-a întâmplat să fie - de a ne adăugă la activitatea științifică, care constituia singura noastră preocupare la Rockefeller, și pe aceea de învățământ. Spre deosebire de Rockefeller, unde departamentul în care lucram nu era implicat într-un proces elaborat de învățământ, la facultatea de medicină a Universității Yale a trebuit să se țină un curs de biologie celulară pe care l-a organizat și l-a condus exemplar, sprijinită in permanență de profesor, Marilyn Farquart. Ținând seama de experiența didactică pe care o aveam din țară - făcusem învățământ universitar la București, practic, 20 de ani - am devenit, dintr-o dată, unele din cadrele vechi, cu experiență, ca să zic așa, în învățământ. Și imediat am fost înglobați, și eu și Maya, în corpul didactic. Așa am ajuns să ținem, rămânând în continuare alături de profesor, cursuri de biologie celulară la Yale.
Aici structura cursurilor respective era în așa fel făcută, încât un curs ca acesta, de pildă, de biologie celulară, care se desfașoară trei luni în fiecare an, nu este susținut de un singur om, cum se obișnuieste la noi. Acolo cursul respectiv era, și este, predat de 15 - 17 oameni, de regula cei mai buni în disciplina respectivă, aduși de la diferite universități, unii dintre ei chiar dinafara SUA, cum suntem noi doi.
În ceea ce ne privește, dupa ce ne-am întors în București - ceea ce s-a întâmplat în 1979 - anual cei de la Yale ne-au reînnoit funcția de Visiting Profesor și ne-au chemat să ținem cursuri aproape 20 de ani, fără întrerupere, cursuri la această universitate americană, unde predăm și în prezent.

Reîntorcându-ne la profesorul Palade, trebuie să vă spun, în primul rând, ca şi la Yale, ca şi mai înainte la Rockefeller, s-a bucurat de o mare reputaţie, adăugând alte şi alte galoane prestigiului său. De altfel, în anul imediat următor mutării noastre la Yale, în 1974, i s-a atribuit, după cum ştiţi, Premiul Nobel.

"E O ÎNTREAGĂ POVESTE FERICITĂ ACEASTA, A NOBELULUL PRIMIT DE PALADE".

NT - Cum a primit vestea atribuirii Nobelului ?

NS - Eu nu am fost de faţă atunci. Vestea, previzibilă, de altfel, am recepţionat-o în avionul de New York, unde mă reîntorceam după o scurtă revenire în ţară. Profesorul mi-a mărturisit recent, la ultima sa vizită în România, din primăvara lui 1992, că păstrează încă biletul pe care i l-am scris eu în avion când am aflat ca i s-a acordat Premiul Nobel. El a primit înştiinţarea în Canada, la Halifax, în Noua Scoţie, unde fusese invitat să ţină un şir de conferinţe. În fine, e o întreagă poveste fericită aceasta, a Nobelului primit de Palade, pe care nu doresc s-o rezum.

NT - Totuşi...

NS - Sigur, a fost un entuziasm teribil în depar¬tamentul nostru. El s-a bucurat enorm. Merita deplin acest premiu. Dar, repet, n-a fost deloc o surpriză, nici pentru profesor şi nici pentru noi, colaboratorii şi apropiaţii săi, care ştiam că mai fusese de câteva ori propus în acest sens. Poate este important să amintesc că anterior primirii Premiului Nobel, în 1973, în perioada în care eu am venit în ţară cu planurile pentru viitorul institut din Bucureşti, am purtat discuţii cu conducerea de atunci a Academiei Române, spunând că Palade trebuie neapărat făcut membru de onoare, pentru că, mai devreme sau mai tarziu, va lua Premiul Nobel. Am incercat să-i conving cu argumente obiective, că este bizar ca un om de calibrul său să nu fie recunoscut de propria ţară. Am vorbit, îmi amintesc, cu Miron Niculescu, preşedintele Academiei, ca, de altfel, şi cu alţii de aici, dar totul a fost zadarnic. Nu s-a realizat propunerea pe care am sugerat-o Academiei Române. Am şi făcut, de altfel, mai multe adrese în direcţia aceasta. Palade nu ştia de demersurile noastre, ale mele şi ale Mayei, dar am considerat că era de datoria noastră să atragem atenţia în acest sens. "E timpul să vă purtaţi ca nişte oameni înţelepţi. Profesorul George Emil Palade ne onora ţara etc., etc." Cert este că n-a fost făcut membru de onoare al Academiei decât după ce i s-a atribuit Premiul Nobel. Cred că adresele noastre de atunci se mai află pe undeva prin arhivele de la Academie.

NT - Cum privea în perioada aceea profesorul Palade relaţiile sale cu România ? Ce discuţii aveaţi în această privinţă ?

NS - Mi-e greu să vă răspund concret la întrebarea aceasta. Palade este un om care e foarte mult axat pe fapte de viață, pe fapte științifice și nu pe fapte politice. Pe el l-a interesat foarte mult să meargă bine colaborarea cu noi și atâta vreme cât colaborarea aceasta a funcționat și apăream împreună prin tot felul de cărți: "the famous squad", "the famous trio", "the Romanian trio", ș.a.m.d., cred că a fost mulțumit. Era o confirmare că într-adevăr, alături de el, se formează niște oameni care, la rândul lor, pot să dezvolte biologie celulară în România. Prin urmare, pe Palade îl interesau - și aceasta constituie una din particularitățile sale esențiale - lucruri de substanță, nu lucruri politice, nu jonglerii din acestea temporare, exterioare preocupărilor sale. Palade, deși iubea și iubește România, nu a fost și nu este genul de om care să spună: "Nu mai pot de dragul țării" și alte bombasticisme asemănătoare. Acestea sunt jurnalisme, care, dupa câte știu, l-au și deranjat în câteva rânduri.
Știu foarte bine, fiind alături de el, că, de pildă, în primele interviuri care i s-au luat când a început să revină în România, i-au fost puse în seamă lucruri pe care nu le afirmase niciodată.

"ÎN S.U.A. NU AM PRIETENI DE CALITATEA LUI JUVARA, A LUI TITEL VEREANU, A LUI POMPILIU POPESCU, A LUI PANAIT SÂRBU"

NT - Să trecem discuția spre un teritoriu despre care, știu sigur, profesorul n-a făcut niciodată economie de cuvinte, atunci când i s-a oferit prilejul să vorbească. Am în vedere maeștrii săi: Rainer, Grigore T. Popa, Boivin.

NS - Într-adevăr, despre astfel de oameni Palade a avut întotdeauna o memorie foarte vie și caldă. A nutrit sentimente de respect față de Grigore Popa. Întâmplarea a făcut ca Grigore Popa să fie și primul meu mentor de aici, din țară, ceea ce a făcut ca discuțiile noastre cu privire la el să fie deosebit de frecvente. Pentru Rainer avea, de asemenea, o prețuire extraordinară. Fusese foarte apropiat de profesorul său mulți ani. Și aș vrea să vă semnalez, în aceeași ordine de idei, o alta temă, dacă pot spune astfel, a numeroaselor noastre conversații: oamenii de cultură din România anilor interbelici. Pentru câteva dintre marile personalități de atunci Palade avea o afecțiune deosebită. Îmi aduc aminte de calda lui apreciere pentru Vasile Pârvan. L-a cunoscut pe Enescu destul de bine și stiu de la el o serie de lucruri legate de marele nostru muzician.

Deseori discuțiile mergeau către prietenii studenției și ai tinereții petrecute la București. "În realitate - mi-a mărturisit nu o dată - eu, în S.U.A., nu am prieteni de calitatea lui Juvara, a lui Titel Vereanu, a lui Pompiliu Popescu, a lui Panait Sârbu". Toți aceștia sunt puși deoparte în inima sa. Ca și Radu Ghiulamila, la care ținea mult. Ei, bine, ori de câte ori ne aduceam aminte de ei, de acești vechi prieteni, erau momente de mare plăcere. Țin să subliniez acest lucru, mai ales că, la rândul meu - deși era o diferență relativ mare de vârsta la mijloc - devenisem, înainte de a

ajunge în America, bun prieten și cu Ion (Cuti) Juvara, și cu Titel Vereanu. Pe urmă, dupa sosirea în America, am interacționat în mod constant și sunt în foarte strânse relatii amicale și sufletești cu Radu Ghiulamila, cu Florica Parhon, oameni cu totul remarcabili. Norocul acesta, prin urmare, de a avea prieteni comuni, de a ne uni și o rețea de senti¬mente, de amintiri comune, a făcut ca legăturile între noi trei, între profesorul Palade, George sau Gigi, cum îi ziceam noi, Maya ș mine, să fie extrem de des¬tinse, să aibă o adâncime și relevanță dincolo de relațiile care se nasc de obicei între un maestru și colaboratorii săi. Legăturile noastre cu profesorul Palade au fost, mult mai mult decât obișnuitele, riguroasele relații profesionale cerute de munca de cercetare.

"TREBUIE SĂ FACI O CASĂ, TREBUIE SĂ AI O GRĂDINĂ ÎN CARE SĂ PUI UN POM"

NT - Cum s-a născut ideea Institutului de Biologie și Patologie Celulară de la București ?

NS - Nașterea acestuia a avut la bază un proces mai lung, pe care îl găsesc absolut firesc și în preajma căruia am putea glosa îndeajuns. Vedeti dv., că vrei să te intorci sau nu vrei să te intorci în țara ta de origine, că vrei săa faci ceva acolo sau nu vrei, eu am considerat și consider că este ceva foarte personal. Nu găsesc că am facut ceva nemaipomenit prin faptul că ne-am întors în România. N-am făcut niciodată caz toți anii trecuți în privința aceasta, deși, cum puteți bănui, facilitățile pe care le-am avut în America le depășeau de nu știu câte ori pe cele ce urma să le primim în România. Dar, încă de la bun început ideea noastră de bază a fost pur și simplu să ne formăm acolo și, cu ce învațăm acolo, să ne întoarcem în țară și să facem o casă. Sentimentul acesta al instituției a fost foarte puternic la noi și e foarte puternic și acuma. Credem, și eu și Maya, în puterea instituțiilor. Trebuie să faci o casă, trebuie să ai o grădină în care să pui un pom. Trebuie să ai o casă în care să pui un robinet, pe care s-o înzestrezi cu tot ce este necesar pentru a putea, în felul acesta, să creăti niște oameni în jurul tău. Niște oameni deosebiți. Să faci, ceea ce se spune în termeni mai pedanți, o școală. O școală pe care s-o ridici la rangul de instituție. Și cum în anii în care noi am început activitatea în America, virtual biologia celulară nu exista în România, gândul de a fi întemeietorii acesteia aici l-am avut în permanență.
Erau, desigur, o serie întreagă de încercări merituoase ale unor oameni, dar virtual biologia celulară nu exista la noi. Când, dupa primul an la Rockefeller ne-am pus problema "ce facem ?", profesorul Palade ne-a spus: "Mai stați un an de zile. Unde să vă întoarceți acolo?" El era foarte realist. "N-aveți unde să lucrați. Nu vă mai puteți întoarce. Avea dreptate, pentru că la București ședeam propriu-zis într-un laborator în care exista un singur microscop cu lumină. Deși lucram și dormeam în laborator săptămâni după săptămâni, totuși absența aparaturii era esențială. De fapt, Palade ne-a

și explicat, la un moment dat, de ce ne-a invitat pe noi, la prima sa vizită în țară, dintre toți cei cu care a interacționat: "Mi-ați facut impresia că sunteți niste sisifi amândoi și mi s-a părut că-i păcat de voi să nu vi se creeze niște condiții de lucru rezonabile". Dar să revin la întrebarea pe care mi-ați pus-o: "Cum s-a născut ideea institutului?". Un prim sentiment a fost următorul - noi trebuie să ne întoarcem. Vom învăța o meserie, având privilegiul să fim lângă un om ca Palade și beneficiind de niște conditii excepționale, oferite de Institutul Rockfeller, dar e de datoria noastră să revenim. Pe de o parte pentru a ne asigura un loc unde să putem sâ continuăm ceea ce am învățat acolo, iar pe de altă parte, dincolo de interesele noastre imediate, să putem să ajutăm, la rândul nostru, tinerii care vor să urmeze această cale, a cercetării în sfera biologiei celulare. Probabil că era la mijloc și un anumit sentiment care ținea de biografia personală, legat, în special, de frustrațiile pe care le-am îndurat în tinerețe. Pentru că am fost un chinuit în tinerețile mele, din punct de vedere a ceea ce am vrut să fac și a modului dureros în care am fost marginalizat în permanență. Nu vreau să mă lamentez și nu vreau să discut despre greutățile, inechitățile crase de atunci, dar nu pot să uit că mi s-au mâncat ani foarte prețioși din viață: nu mi se dădea voie să ies nici măcar până la Sofia, la un congres științific. Cu toate că publicasem deja destul de mult în străinătate. Și tot așa: nu și nu, și nu, și nu. Poate cu un alt prilej, o să vă povestesc o serie din nedreptățile din acea perioadă.

Ideea de reținut este, în esență, aceasta: voința mea și a Mayei, ca atunci când vom putea să-i ajutăm pe tineri să nu mai sufere ce-am suferit noi, să nu ezităm. Simplu de spus așa ceva, dar, cum bine știți, foarte greu de realizat. Eram, prin urmare, conștienți că întorcându-ne în România o să avem mari bătăi de cap. Dar am făcut-o, fără nici o ezitare. N-am avut, nici un fel de gânduri vreodată să facem altceva decât să ne întoarcem aici. Și, la un moment dat, în 1972, într-o suită de împrejurări care sunt foarte amuzante, dar nu e timp să discutăm despre ele, m-am așezat, împreună cu Maya, în fața unei hârtii de împachetat și am spus și unul și altul în același timp: "Hai să facem un centru modern de biologie celulară, să adunăm niște tineri în jurul nostru, să-i formăm ca un fel de familie și să asigurăm, astfel, o oază de muncă și de liniste, și de seriozitate". Planurile inițale, devenite spre sfârșit din ce în ce mai consistente, le-am arătat și profesorului Palade. El, sincer vorbind, s-a arătat destul de sceptic că vom reusi să facem așa ceva. L-am înțeles foarte bine, pentru că a încerca să aplicam planul nostru, însemna, practic, a intra într-o aventură al cărei sfârșit era greu de prevăzut din punctul lui de vedere.

NT - Deci profesorul s-a arătat mai degrabă neîncrezător...

NS - Scepticismul lui era îndreptățit. Entuziamul nostru, desigur, își avea justificarea sa, dar el, mai realist decât noi, anticipa că vor fi foarte mari greutăți și că va dura foarte mult până la materializarea unui asemenea proiect. Riscurile, apoi, pe care le presupunea o asemenea inițiativă, erau extrem de mari. În fine, în acelasi an, 1972, am transmis o propunere la autoritățile române. Dacă îmi aduc bine aminte, am

transmis-o prin profesorul Burghele, care era la Ministerul Sănătății. În 1973 - aproape că nu ne venea să credem - am primit răspunsul că propunerea noastră pentru înființarea unui centru de biologie celulară este aprobată, dar cu condiția ca noi să ne ocupam de el. Să asigurăm planurile arhitecturale de dotare, pentru că modele, în privința aceasta, în țară nu existau. Vedeți, daca voiai în România, la momentul acela, să faci, să zicem, o clinică de chirurgie, aveai excelente exemple, existând numeroase clinici conduse de chirurgi de prima mână. Nu era nevoie să te inspiri din altă parte, nici din punct de vedere organizatoric, și nici profesional. Dar ca să realizezi un institut de biologie celulară pornind de la zero, nu era deloc ușor. Și atunci, din tot ce am văzut la Rockefeller și în alte țări din Occident – și, desigur, am avut prilejul în anii respectivi să vedem foarte mult - am căutat să selectăm cele mai viabile soluții.
Am făcut, Maya și cu mine - și acele schite inițiale ne-au fost de mare folos - un plan pe care l-am trimis la București. Încă o dată vă spun: profesorul Palade era destul de sceptic în privința reușitei. Planul a fost aprobat de principiu, cerându-ni-se să venim să purtăm discuții la București. Aici am stat de vorbă cu o serie de oameni, în special cu profesorul Burghele și cu Paul Niculescu Mizil, care era ministrul Învățământului. Burghele a fost cucerit de idee și acest lucru a fost deosebit de important, deoarece el avea influență, avea trecere la autorități.
Așadar, pe scurt: din '73 și până în '79 am revenit în țară în fiecare an. Practic, am petrecut vacanțele noastre lucrând cu constructorii, cu ar-hitecții, cu instalatorii. În '77 a fost și cutremurul deosebit de violent, care a întârziat și el lucrările. Câteodată am stat în țară o lună, altădată două luni, altădată trei luni de zile. Profesorul a fost, însă, alături de noi. A fost foarte înțelegător, deși americanii spuneau că suntem niște "patrioți superstițioși" și nu înțelegeau de ce ne trebuiau nouă asemenea complicații. Aceasta, mai ales că atmosfera de destindere de prin anii '68, când România a refuzat să intre în Cehoslovacia, devenise, în anii '75 -78, o amintire.
Au fost și alte semnale care pentru niște oameni nu prea bine orientați politic, cum eram noi, erau departe de a fi anunțătoare de o oarecare îmbunătățire a situației. Așa că atunci când noi ne-am întors în România, situația generală a țării era deja profund alterată. Îmi amintesc vorbele din acea vreme ale profesorului Palade: "Mai gândiți-vă încă o dată înainte de a face acest pas". Deci el, încă o dată, și-a exprimat rezerva că totul va merge foarte bine. Aceasta chiar în ciuda faptului că, de pildă, la venirea sa în București, în 1975, după ce a primit Premiul Nobel - atunci a fost făcut membru de onoare al Academiei Române -, a pledat răspicat pentru realizarea institutului nostru pe lângă autorități. "E bine să faceți așa ceva" a susținut în întâlnirile oficiale. Mai mult chiar, a adăugat : "Acest exemplu trebuie repetat și in alte domenii". Când, anul trecut (n.r. - 1992), a venit la Conferința Rectorilor de la Sinaia, a exprimat aceeași poziție: "Modelul Simionescu trebuie repetat și în alte domenii..."

"IBPC ERA, IN MINTEA DICTATORILOR, O AGENTURĂ DE SPIONAJ A CIA"

NT - Din câte ştim, profesorul Palade a vorbit, nu o dată, cu diferite prilejuri, despre "Experimentul Simionescu".

NS - Da, "Experimentul Simionescu". Palade a rămas constant pe ideea aceasta. Este cert că fără contribuţia sa la sensibilizarea autorităţilor române, fără prestigiul său, lucrurile ar fi fost mult îngreunate. Din nefericire, paranoia instalată la conducere, în special după 1980, a făcut ca Palade să nu mai fie primit în ţară cu consideraţia dinainte, să nu mai fie consultat. Acum, când mergea în ţară, el venea la noi la institut, ţinea aici o conferinţă, mai interacţiona cu nişte oameni. Doar atât. Nu-l invita nimeni la Universitate, nu-l invita nimeni la Facultatea de Medicină. Când îi văd azi pe toti "eroii" aceştia care fac atâta show în jurul lui, nu pot să-mi opresc zâmbetul. Mă intreb de ce niciodată Facultatea de Medicină din Bucureşti nu l-a chemat pe marele Palade să ţină cursuri la studenţi. Acum, cand s-au schimbat lucrurile, toţi au devenit curajoşi. Toti îl revendică pe Palade. Spun asemenea lucruri cu toată responsibilitatea. Cu toată tristeţea.
Deci Palade a avut drumul totdeauna spre acest institut, în care, atât cât a putut sâ se reîntoarcă în ţară, la doi ani sau şi mai rar, venea şi stătea câteva zile. Aveam, de fiecare dată discuţii foarte interesante cu el. Aceasta este realitatea. În afara de institut, unde era întotdeauna primit ca un mentor, celelalte instituţii, practic, îl ignorau. Iar dintre cei care reprezentau autorităţile, nu mai îndrăznea să-l primească nimeni. Vă aduceţi aminte, nu, că Madam Cutare de pe vremea aceea, considera că prestigiul unui laureat al Premiului Nobel este o nimica toată faţăa de "prestigiul" ei mondial. Şi starea aceasta de lucruri a mers mână în mână şi cu înrăutăţirea situaţiei noastre, a mea şi a Mayei, care am fost supuşi unor tot mai aspre îngrădiri. Dar intrăm deja într-o altă poveste, intrăm în domeniul lamentărilor şi nu vreau să insistăm.
Ne-a fost, aşadar, din ce în ce mai greu să plecăm din ţară, depăşindu-se, în 1989, acuzaţiile de tip formal. Astfel, acum am fost chemaţi la minister, unde ni s-a spus: "Şeful Securităţii, tovarăşul Postelnicu, vă acuză că sunteţi spioni americani, care vindeţi Statelor Unite secretele ştiinţifice ale României". Ni s-au cerut o serie de documente prin care să arătăm că nu am vândut secrete. În fine, a fost o perioadă foarte tristă...

NT - Întrebat, la un moment dat, dacă a fost urmărit de Securitate (Curierul Românesc, iunie, 1992), profesorul Palade a dat următorul răspuns: "Am fost, probabil, urmărit de câte ori am venit să-mi vad surorile, să-i întâlnesc pe profesorii Nicolae şi Maya Simionescu, să particip la diferite simpozioane. Câtă vreme regimul nu-şi putea exercita în întregime influenţa asupra Institutului de Biologie şi Patologie Celulară, (institut care beneficia şi de o importantă finanţare americană), era firesc să fiu urmărit, deoarece eu aici veneam la întâlniri de lucru cu cercetăatorii români. Or,

IBPC era, în min¬tea dictatorilor, o agentură de spionaj a C.I.A."

NS - Da, așa au stat lucrurile. Presiunile exercitate asupra noastră au fost din ce în ce mai consistente, mai dese. Organizat cu suport din partea S.U.A., în septembrie 1989 am avut un workshop româno - american. Am fost chemați la minister și trași la răspundere: "Trebuie să vă apărați, ni s-a spus, că aveți trei capete de acuzație. Primul că sunteți spioni, pentru că ați vândut secrete științifice românesti americanilor. Al doilea, tot ce ați lucrat, toate temele pe care le-ați avut n-au fost niciodată aprobate de statul român..." Se susținea, deci, că am lucrat în particular, sau cam așa ceva, că am făcut doar ce am vrut noi. Și dacă prima acuzație era o aberație, în chestiunea că noi am făcut în institut doar ceva ce am socotit că trebuie săa facem, era chiar adevărul. Nu eram, să zicem, prea bine acoperiți din punctul acesta de vedere, deși ne-am îngrijit să fim, an de an, prinși, totuși, în planurile de cercetare ale ministerului.

NT - Și a treia acuzație ?

NS - Era de-a dreptul pueril și relativ ușor de contracarat. În esență, eram învinuiți că nu publicam decât în America și ca n-am publicat nimic în România. Or realitatea era că publicasem foarte mult și în România. La argumentele aduse de noi, ni s-a precizat că trebuia să publicăm mai întâi în România și abia apoi în străinătate. Ca și cum cineva poate să publice o lucrare științifică de două ori...

"CLIPELE DE SĂRBĂTOARE ADEVARATĂ N-AU ȚINUT PREA MULT"

NT - Să insistăm asupra momentului inaugurării activității institutului, moment care, dincolo de greutățile în fond inerente, a constituit un moment de răscruce în viața dv.

NS - Am avut atunci, în 1979, un simpozion in¬augural, la care a fost prezentă o serie întreagă de somități, între care capetele de afiș le-au constituit Palade și de Duve, cu care profesorul a împărțit, în 1974, Premiul Nobel. Clipele de sărbătoare adevărată n-au ținut însă prea mult. Pentru că ministerul ne-a adus la cunoștință că nu poate să ne asigura nici un fel de fonduri. Înțelegeți, dupa ce am făcut tot ceea ce am făcut pentru înființarea institutului, după ce am revenit în țară, ni s-a spus: "Regretăm, dar din momentul acesta sunteți fără nici un ban". Și atunci soluția a fost una singură: să apelăm la niste subvenții din afară. Am intrat, astfel, în sistemul de competiție pe care-l folosesc Institutele Naționale de Sănătate din S.U.A. (The U.S. National Institutes of Health, prescurtat NIH). Și, spre șansa noastră, înregistrând scoruri suficient de bune, am primit timp de nouă ani subvențiile solicitate. Am fost singurul institut din Est care a beneficiat de sprijin.
Pe deasupra, americanii care ne cunoșteau foarte bine din ceea ce am publicat, și eu și Maya fiind profesori ai Universității Yale, ne-au trimis anual, o bună bucată de timp, studenți pentru a-și face lucrările de diplomă la noi la institut. Ei veneau pe perioada

de vară, trei luni de zile, și făceau aceste lucrări în special sub conducerea Mayei Simionescu. Am avut în institut 7 studenți subventionați de Universitatea Yale.
Semnificativ este că în aceeași perioadă nici unui student de la Facultatea de Medicină nu i s-a permis să-și facă lucrarea de diplomă la noi. Justificându-se totul în fel și chip. E o chestiune, nu-i așa ?
Pe lângă fondurile pe care le-am primit prin grant-urile amintite, puse la dispoziție de Institutele Naționale de Sănătate (NIH), fonduri care s-au ridicat în total la peste 400.000 dolari, din 1979 și până în anul acesta noi ne-am făcut un obicei - nu foarte confortabil, nu foarte simplu - din a aduna materiale pentru institut. În acest mod, colectam de la prietenii noștrii, de la colegi, de la cunoscuți, chimicale, cărți, reviste, chiar unele piese de echipament, chiar unele aparate mai costisitoare. Le împachetam, le încărcam într-un camion pe care-l inchiriam și-l conduceam de la New Haven la aeroportul Kennedy din New York (cca 120 km). Aveam o combinație cu TAROM-ul din București, care ne permitea să plătim transportul în lei. În medie transportam cam o tonă de materiale și echipament în fiecare an. Cu totul am transportat până acum peste 14 tone. N-am făcut niciodată caz de lucrurile acestea, dar cred că trei pătrimi din ceea ce există în institut sunt lucruri aduse de noi. Dacă puneți la socoteală și faptul că n-am primit aproape deloc sprijin valutar de la statul român, se poate spune, pe bună drep¬tate, că, într-un fel, cum ni s-a și reprosat, ca institutul e făcut „la particular". însumate, valorile lucrurilor aduse de noi s-au ridicat la cca 800.000 de dolari. Cum investiția pentru institut, cu aparatură cu tot, a fost de peste 700.000 de dolari, aș putea zice că am amortizat investiția respectivă prin ceea ce am adus în țară. Să vă mai spun că o doamnă ministru a învățământului ne-a trimis în institut o comisie de anchetă să vadă ce fel de publicații suspecte am strecurat in tara, aflând că ne-au venit de la aeroport un transport din coletele pregătite de noi în S.U.A.
Fără aceste materiale aduse, institutul nu ar fi putut funcționa. Vă spun sincer că nu era deloc amuzant să împachetezi între 50 și 100 sau mai bine de 100 de colete, să le încarci (numai Maya și cu mine), pe urmă să șofezi camionul, care avea două tone, să-l duci pe drumul ăla, pe drumul ălălalt, apoi să descarci aceleași colete la aeroport. La Otopeni, câte un coleg de-al nostru, venit să ne ajute la descărcat, se plângea, mai în gluma, mai în serios: "Domn' profesor, nu mai faceți așa grele coletele! Făceți-le mai ușoare..."

NT - Cum privea profesorul Palade toate aceste "aventuri" ?

NS - Înțelegea deplin ce efort făceam. Înțelegea sacrificiul nostru și, atât cât i-a stat în putință, deși inițial ne avertizase ce ne așteptа, ne-a ajutat, ne-a susținut moralmente. Bineînțeles că s-au găsit unii și altii din țară care să spună: "Păi de ce Palade nu susține bănește institutul? De ce nu dă bani?" Or Palade era un cercetător, un salariat în definitiv. Ca să nu mai vorbesc de enormitățile proferate de propaganda comunistă, ca Palade și-a dat Premiul Nobel României și pe baza banilor respectivi s-a făcut institutul acesta. Și tot așa, alte și alte invenții. Omul Palade, cu cele mai bune intenții

pe care le-ar fi avut, nu putea să dea institutului decât prestigiul lui. Şi, cu adevărat, în permanenţă prestigiul său imens s-a răsfrânt benefic asupra acestei instituţii.

"NICOLAE, ŞTII CARE ESTE IMPRESIA MEA DESPRE INSTITUTUL VOSTRU ? CĂ SUNTEŢI AL 52-LEA STAT AL SUA"

NT - Vă rog să comentaţi următoarea afirmaţie a profesorului Palade, flatantă într-adevăr, făcută la adresa dv. şi a doamnei Maya: "Americanii au fost plăcut surprinşi să constate ca în realitate ei au învăţat mai mult de la cercetătorii români decât cercetătorii români de la ei. Asta nu se întâmplă deseori în lume Se întamplă rareori. Totul se datorează felului în care a fost organizat acest institut de către profesorii Nicolae şi Maya Simionescu, biologi celulari de notorietate internaţională, care au lucrat în laboratorul meu din SUA, fiecare câte zece ani".

NS - Mai mult decât a spus profesorul, ce-aş mai putea spune? Este, cu siguranţă, o apreciere deosebit de amabilă la adresa noastră, o apreciere deosebit de generoasă. Realitatea e – şi profesorul Palade, care a format în laboratorul său cercetători de elită, ştie mai bine decât oricine lucrul acesta – că institutul din Bucureşti, prin rezultatele cercetărilor sale, materializate în atatea cărţi, comunicări, articole care au intrat în circuitul ştiinţific major, este undeva pe hartă şi meritul e nu numai al nostru, al meu şi al Mayei, ci al întregului colectiv de aici, al tuturor oamenilor care au lucrat alături de noi atâţia ani. În mod deosebit, aş vrea să menţionez pe unii dintre cei cu stagii mai vechi şi realizări ştiinţifice deosebite: Doina Popov şi Ina Heltianu (recent primite ca membrii corespondenţi ai Academiei de Ştiinţe Medicale), Anca Sima, Felicia Antohe, Nona Constantinescu, Ileana Mânduţeanu, Cristina Lupu, Dorin Alexandru, Monica Raicu, Florin Lupu ş.a, iar dintre cei mai tineri Ludy Dobrilă, Anca Dobrian şi alţii în curs de formare. Pentru contribuţii importante şi organizatorice, i-aş menţiona pe C. Neacşu, Maria Calb, V. Jinga, A. Hillebrand. Proiectele de cercetare beneficiază şi de un excelent grup de tehnicieni şi laboranţi. Este foarte important că emblema institutului este pe toate aceste tratate pe care le vedeţi aşezate în rafturile pline din biroul meu.

Institutul are un binemeritat prestigiu şi-n acest prestigiu este chiar viaţa noastră, a întregii familii de cercetători de aici. Pe Simionești putem să-i ignorăm, dacă asta doreşte nu ştiu cine, dar de Institutul de Biologie şi Patologie Celulară nimeni nu poate face abstracţie. El şi-a câştigat o poziţie fermă în elita disciplinei. Iată, am la îndemână o analiză făcută de o revista americană, Genetic Engineering News, unde se consideră că în anii regimului Ceausescu, practic, în România a existat un singur institut de prestigiu. Scrie pe larg aici, între alte afirmaţii pozitive: "The U.S. National Institutes of Health (NIH) and NSF have been supporting Romania's Institute for Cellular Biology and Pathology (ICBP) since 1980 with the only U.S. grant given to a Eastern European country. The ICBP was founded by Dr. Nicolae Simionescu and his wife, Dr. Maya Simionescu, who are cell biologists with world-class reputations

in cardiovascular research. Both were faculty members of the Rockefeller University and Yale before organizing the Institute. The Simionescus' current publications report work on the cell biology of atherogenesis, the role of endothelial cells in hypercholesterolemia and platelet structure - function relationships. The ICPB stands as an exception to the rest of Romanian science which, during the Ceaucescu regime, was ruled by the dictators' wife, Elena…"

Un lucru interesant, în anii respectivi, a fost acela că, deși noi înșine aveam tot mai mari dificultăți cu ieșirea din țară, în urma a tot soiul de lupte, care durau câteodată un an sau chiar doi ani de zile, am reușit să trimitem foarte mulți oameni din institut în străinătate. Și, ceea ce e remarcabil, este că în acei ani nu a rămas nimeni afară. Ajunsesem, într-un anume fel, să fim, poate, singura instituție din România din care nu "dezertase" nimeni. Acest fapt a constituit pentru mine un atu foarte important când mă luptam pentru oamenii mei. Toate piedicile, ba că nu-i membru de partid, ba că e soră-sa sau frate-său sau nu știu ce unchi sau mătușa pe nu știu unde, în nu știu ce țară ș.a.m.d., le înlăturam pe rând cu acest argument infailibil: nici unul din cercetatorii noștrii trimiși peste graniță nu a rămas acolo, ci a revenit, la termenele respective, la cuib, la institutul mamă. Formula găsită de Maya și folosită intr-un interviu, pentru a exprima aceasta situație, a fost una foarte potrivită: "to beat the system" - "să batem sistemul". Și prin activitatea, și prin rezultatele noastre tocmai acest lucru l-am realizat.

Curios este că dupa Revoluție, o parte din cei care au luptat alături de noi, au preferat, de data aceasta, să rămână în străinătate. S-a întâmplat, în orice caz, un fenomen psihologic foarte curios. Oamenii considerau că am batut sistemul și nu mai vor să lupte, în condițiile actuale, cu dificultățile. Și fiecare vrea să se relaxeze mai mult, să plece, și încă definitiv, în străinătate. Înțelegeți dv., aceeași oameni care au rezistat ani în șir alături de noi în epoca lui Ceaușescu, acum spun: "M-am săturat. Am ajuns la 40 de ani, am luptat alături de dv., credeam într-o idee. Dv. ați fost totdeauna un poet, ne-ați fascinat zece ani de zile și am trăit in aceeași casă, dar acum a rămâne în țară, în brambureala asta, e un sacrificiu inutil. Plec să câștig niște bani, să-mi fac o viață mai bună. Lipsesc câțiva ani de zile poate și mă întorc după aceea." O să vedem dacă se vor mai întoarce. Să sperăm că o vor face.

NT - Institutul de Biologie și Patologie Celulară din București merge însă înainte...

NS - Meritul enorm este că el a supraviețuit, că există aici.

NT - A fost, și a rămas și azi, un punct de atracție pentru o serie de personalități din străinătate când sosesc în România.

NS - La noi a venit foarte multă lume. Sosiți chiar pentru cu totul alte probleme la București, numeroși oameni au ținut să vadă institutul, să ne cunoaștem. Îmi aduc aminte, de pildă, că unul din directorii generali de la National Science Fundation,

Glenn Schwaitzer, când a ieşit din clădire, mi-a mărturisit: "Nicolae, ştii care este feeling-ul meu despre institutul vostru? Că sunteti al 52-lea stat al S.U.A." Era surprins că am reuşit, în ambianţa generală din trecut, să menţinem Institutul nostru ca o oază.

NT - Mirarea domniei sale era absolut întemeiată...

NS - Vedeţi dv., d-le Ţone, în toată această vreme n-am dat nimănui nici un interviu. N-am vrut să apărem niciodată la televiziune. N-am vrut să scriem nici un articol despre institut, solicitat de propaganda oficială. N-am facilitat, n-am cerut nici un fel de vizită la noi când toata lumea ne spunea: "Chemaţi-o pe Doamna Cutare" ori: "Invitaţi-l pe Preşedinte". N-a călcat nici un nepoftit cu piciorul aici. Poate că, în acest fel, nici nu prea s-a ştiut exact cu ce ne ocupăm noi. Şi anii au trecut şi noi ne- am văzut de ale noastre.

"SENTIMENTELE PENTRU UN OM DE CALIBRUL LUI PALADE TREBUIE SĂ RĂMÂNĂ DE O ÎNALTĂ PURITATE"

NT - Am ajuns, iată, din aproape în aproape, şi la ultima întrebare a dialogului nostru. Cum îl vedeţi dv., ca personalitate ştiinţifică în secolul acesta, pe George Emil Palade?

NS - Profesorul Palade este, în felul lui, un unicat, fără doar şi poate - şi perceptia mea în ceea ce-l priveşte are parametri multipli, pentru că, practic, interacţionez cu el foarte strâns de 23 de ani, şi pot spune că-l cunosc mai bine decât mulţi alţii. Şi concluzia aceasta capătă tot mai multă consistenţă pe măsură ce trece timpul. Ne-am revăzut ultima dată cu el de curând, în decembrie 1992, când a venit să-şi petreacă o seara la noi, la New York. Şi anul acesta ne-a invitat să-l vizităm, să stăm mai mult timp împreună. Mai avem încă de lucru la nişte proiecte comune. El este, deci, un exemplar unic, o veritabilă "rara avis". Luat în totalitate, Palade reprezintă unul dintre marii oameni de ştiinţă ai secolului. Personalitatea sa este una a profunzimilor, omul de ştiinţă completându-se armonios cu omul de cultură, cu omul dăruit cu o mulţime de alte talente. Este, dacă pot spune aşa, un campion al decenţei şi dacă-l respecţi, dacă-l iubeşti pe Palade, trebuie să-l lasi pur şi simplu în lumea lui şi nu să-l expui în tot felul de show-uri, cum fac în prezent la noi unii care, vorba poetului, pentru a se preamări pe ei, şi-au adus aminte peste noapte, că Palade există pentru România.
Avem datoria să-l protejăm, dacă chiar îl iubim, de asemenea show- uri propagandistice. Orice exagerare de felul acesta, al spectacolului gratuit, sunt sigur că nu-i este nici lui agreabilă. Şi, repet, dacă într-adevăr îl simţi ca grandoare umană pe Palade, se cuvine să nu ieşi, în nici un chip, din decenţa, din civilitatea care-i sunt atât de proprii. Sentimentele pentru un om de calibrul lui Palade trebuie să rămână de o înaltă puritate. Palade nu are nevoie de titluri de complezenţă din partea unor asa-zise persoane de vază care abia dacă-i pronunţă bine numele. Palade nu are nevoie de

astfel de titluri. Palade are nevoie de un respect profund și genuin. Lăsați-l în pace pe Palade cu titlurile propagandistice. Ele nu fac decât să-i adauge o pojghiță care nu i se potrivește. Palade nu are nevoie de decorații cotidiene din partea celor care până mai ieri - alaltăieri se prefăceau că n-au auzit de reputația sa universală. Așa gândesc eu. Nu știu dacă și Maya are aceleași convingeri cu privire la festivismul sec care se practică de la o vreme în privinta profesorului. Ne considerăm, însă, amândoi, niște privilegiați pentru faptul că am avut norocul să ne formăm alături de el. Aceasta pe de o parte. Pe de altă parte, îl considerăm unul dintre oamenii cei mai apropiați de inima noastră. Îl cunoaștem de aproape două decenii și ne-am înțeles și ne înțelegem foarte bine și, de aceea, aprecierile noastre în privința sa au mers totdeauna cu mult dincolo de Palade-care-a-luat-Premiul-Nobel. Pentru noi, el nu este numai un simbol, ci este și trebuie să devină pentru tot mai mulți oameni de aici, de acasă, un argument major al emancipării științifice și, deopotrivă, morale. Este cel putin bizar că influența sa asupra dezvoltării științei, asupra dezvoltării cercetării fundamentale în România nu are cursul scontat.

A venit, l-au decorat, l-au facut cetățean de onoare, a plecat și cu asta gata. Lucrurile au rămas tot cum au fost inițial.

Nu credeți că este, în sfârșit, timpul să-l descoperim cu adevărat pe Palade? Și, mai ales, să-l prețuim cu adevărat ?

București, aprilie 1993

POLITICA ȘTIINȚEI ÎN VIZIUNEA PROFESORULUI NICOLAE SIMIONESCU

ACADEMIA – MAXIMA SCIENTIA ET MAXIMA MORALIA
MAYA SIMIONESCU, NICOLAE SIMIONESCU

ARTICOL APĂRUT ÎN REVISTA „ACADEMICA" NR. 6, 1991

În primul său an de eforturi de reorganizare, Academia Română și-a concentrat majoritatea activității – în mare măsură inerent – în acțiuni de reparare a unor injusteți, comemorări și primiri de noi membri. Acum a venit timpul ca Academia să se ocupe de viitorul ei cu tot ceea ce și-a asumat să facă pentru ea, pentru cele 54 unități de cercetare pe care le-a preluat și pentru Comunitatea Științifică pe care o reprezintă. De mai multe decenii aceasta din urma a fost privată de sentimentul reconfortant de a se uita de jos în sus la forul suprem al culturii și științei românești. Conturarea precisă a felului în care Academia Română înțelege să-și proiecteze și substanțieze viitorul ei și al domeniilor pe care le patronează, ar trebui să fie însăși sensul și mesajul Comemorării a 125 de ani de activitate. Impactul deosebit pe care această unică instituție îl poate avea pentru România de mâine, reclamă deopotrivă aduceri aminte cât și marcată proiectare în viitor.
Dintre multiplele și variatele probleme pe care considerăm că Academia (înțelegând prin aceasta toți membrii ei) este datoare și are capacitatea de a le rezolva în viitorul imediat dorim să subliniem câteva. Ne vom referi în mod special la domeniul științelor.

A. ACADEMIA ESTE EMANAȚIE ȘI PARTE A COMUNITĂȚII ȘTIINȚIFICE

În activitatea ei curentă, Academia Română trebuie să reflecte în mod convingător că se conduce după ideea că nu este un izolat autoprodus, ci o parte, o emanație a Comunității Științifice (care își merită în egală măsură început numele cu litere mari). De opinia acestei comunități trebuie să se țină seama în orice acțiune, începând cu primirea de noi membri și mergand până la elaborarea noilor reglementări privind cercetarea științifică și statutul cercetătorului. Când o semnificativă fracțiune a Comunității Științifice extramurale își exprimă indoieli sau dezacordul față de unele acțiuni ale Academiei, se așteaptă ca aceasta să reacționeze corespunzător, pentru a nu-și altera sau pierde suportul moral al intelectualității pe care o reprezintă.
Cu cât o țară a atins un nivel mai ridicat de performanță științifică, cu atât este mai largă, mai vie și mai productivă osmoza bidirecțională dintre Comunitatea Stiintifica si organismele de promovare a efortului de cunoaștere și de consacrare a făuritorilor de cultură. Sunt numeroase exemple (Statele Unite ale Americii, Japonia, Suedia, Germania, Finlanda și altele), care reflectă ideea de bază fiind că activitatea unei academii nu este o treabă exclusivă a membrilor ei, ci a întregii Comunități Științifice.

B. NECESITATEA UNUI SISTEM DE CRITERII OBIECTIVE PENTRU EVALUAREA UNEI CANDIDATURI

Este cunoscut modul abuziv și regretabil prin care, în ultimele decenii, unele primiri în Academia Română s-au făcut pe merite predominant sau exclusiv politice. În prezent, asemenea academiilor de științe din țările avansate, Academia Română trebuie de urgență să emită un Sistem de Criterii Obiective care să permită analiza și evaluarea corectă a activității științifice a unui candidat. Este singurul mod prin care se poate evita subiectivismul și evaluări făcute sub impulsul simpatiilor sau al antipațiilor personale.

Desigur, criteriile urmează să fie particularizate conform cu specificul fiecărui domeniu.

După un astfel de sistem ar urma să se conducă atât instituțiile care propun, cât și secțiile Academiei Române care evaluează oportunitatea unei candidaturi.

În mișcarea științifică internațională s-au conturat clar o serie de criterii unanim admise și consecvent aplicate. Ele operează atât la primirea într-o academie de știință, cât și la promovări în gradul de profesor, profesor asociat sau șef de departament (chairman). În universitățile de renume în care activitatea științifică este o prestație esențială pentru promovarea la gradul de chairman ori profesor, doar activitatea didactică – oricât de apreciată ar fi – este insuficientă dacă nu este dublată de cea de scientist.

Desigur, revine conducerii Academiei rolul de a organiza urgenta elaborare și folosire a unui astfel de sistem; noi vrem doar să subliniem unele din criteriile cheie intrate în mecanismele de lucru uzuale ale academiilor de prestigiu.

1. Evaluarea activității științifice a unui candidat trebuie făcută de specialiști din Academie sau/și din afara ei.

Acest "peer review" (asupra caruia insista și Profesorul Michael Sela de la Institutul Weizmann din Rehovot, în recentul său discurs ținut în aula Academiei Române) incumbă o mare responsabilitate din partea celor ce-l efectuează. De regulă, acestia sunt 2-3 experți, în cazuri mai deosebite apelându-se și la specialiști din străinătate. Fără o astfel de evaluare de specialitate, supunerea unei candidaturi votului Adunării Generale a fost și este principial invalidă.

2. Propunerea și invalidarea candidaturilor.

Odată evaluările formulate în scris, propunerile sunt examinate în secția de profil. Aici apare o altă imperfecțiune organizatorică, deoarece potrivit actualului Statut al Academiei Române (Art.11, paragraful al doilea), "lista candidaților propuși de o secție, se stabilește prin vot secret cu majoritatea de 2/3 din numărul total al membrilor titulari ai secției respective". Cu alte cuvinte, în mod arbitrar, membrii corespondenți nu au dreptul de a vota propunerea unui nou candidat. Situația devine și mai serioasă în unele situații, ca de pildă cea de Științe istorice, în care exista 3 membri titulari și 10 membri corespondenți; probabil că mai sunt și alte exemple similare.

În etapa următoare a acestui mecanism, anume cea a Adunării Generale, membrii corespondenți (unii nou intrați, altii în aceasta poziție de unul-două decenii) sunt din nou privați de a-si exprima opțiunile prin vot. Datorita inerenței heterogeneității a Adunării Generale rezultată din stricta specializare a membrilor titulari, aceștia sunt puși in cele mai multe cazuri în situatia de a vota formal candidați despre care cunosc foarte puțin sau nimic, în timp ce cei care îi cunosc nu au dreptul să voteze pentru simplul motiv că sunt "doar": membri corespondenți. Aceștia din urma, primiți în Academie pentru merite științifice, dar și in scopul infuziei unui spirit modern, sunt în mare măsură reduși, fără nici o bază reală, la un rol de spectatori. Ei pot fi consultați, solicitați să participe la unele acțiuni, dar ținuți în afara mecanismului de luare a deciziilor. Curioasă treabă și greu de imaginat cum se va putea astfel reprimeni activitatea Academiei noastre.

Ca să întregească șirul contradicțiilor, articolul 59 din Statut dă și membrilor corespondenți dreptul de a vota o eventuală modificare a Statutului.

Considerăm că o analiză obiectivă și responsabilă a unor prevederi din actualul Statut va convinge Prezidiul Academiei Române (cât și pe membrii ei), că o astfel de modificare cât și a altor prevederi preluate din vechiul statut se impune în mod presant în cursul acestui an.

3. „Generația calendaristică" vs. „generația științifică".

Aici se impune o precizare. Spiritul nou și concepția modernă asupra cercetării și organizării ei nu sunt un atribut exclusiv al „generațiilor mai tinere". Prin pregătire, experiență, condiții de lucru, calități personale, potențial biologic și performanță profesională, fiecare dintre noi poate fi definit și prin doi parametri care reflectă apartenența la o anumită „generație": generația biologică și generatia științifică. Generatia biologică (calendaristică) se dovedește, în unele cazuri, a fi neesențială, cum este exemplul unor eminenți oameni de știință ca Profesorul Stefan Milcu sau Profesorul George Palade (și exemplele sunt numeroase). Beneficiari ai unei structuri biologice și intelectuale de excepție, prin felul în care gândesc și acționează ei au aparținut și aparțin în continuare generației științifice tinere, de avangardă. Cât de relativ este impactul generației biologice asupra performanței profesionale se poate vedea și în strălucitele exemple din alte domenii ca cele ale artei și culturii (P. Picasso, P. Cassals, A. Rubinstein, A. Horowitz ș.a.).

4. Unele criterii obiective de evaluare a activității științifice.

Conform precizării din articolul 7 al Statutului Academiei, membrii ei sunt aleși dintre oamenii de știință și cultură de înaltă ținută morală și cetățenească care s-au distins prin lucrări originale de mare valoare (sublinierile ne aparțin).

Cu excepția unor cazuri notorii, în general, parametrii morali și cetățenești sunt dificil de evaluat pe criterii inatacabile. Pentru activitatea științfică însă există o serie de criterii acceptate unanim, dintre care ne vom referi doar la câteva.

(a) Lucrări originale publicate și omologate internațional. O valoare convingătoare o au lucrările publicate în reviste internaționale de prestigiu care folosesc sistemul referenților. În prezent, este imposibil ca o descoperire științifică

publicată în limba română să aibă impactul pe care îl merită în domeniul respectiv. (Problema revistelor românești care publica articole în limbi străine a ajuns, pentru majoritatea publicațiilor, într-un impas care necesită o analiză separată). Știința are un pronunțat caracter integrativ internațional. Dinamica și ritmul informației științifice contemporane nu numai că se deosebesc fundamental de cele ale secolului trecut, dar se schimbă de la un deceniu la altul.

(b) Citarea în literatura de specialitate. Atestarea valorii unei lucrări publicate în străinătate se face printr-un lant de reacții: acceptarea de către recenzori, numărul de cereri de extrase și, mai ales citarea în literatura domeniului respectiv sau în cele colaterale. Dacă o lucrare a trecut neobservată de colegii din domeniu, valoarea ei științifică rămâne, cel puțin pentru un timp, îndoielnică. Cazuri de redescoperire în literatură a unei lucrări importante vreme îndelungată ignorată, sunt astăzi potențial extrem de rare. În multe domenii există în prezent publicații speciale care redau detaliat fiecare citare a unei lucrări publicate. Pentru biomedicina apare la Washington D.C. (SUA) cunoscutul "Citation Index", în care nu numai forurile de consacrare, dar și fiecare cercetător își poate vedea răsunetul avut de un anumit articol. Unele institute din străinătate (Japonia, SUA, Canada, Germania, Israel, Ungaria ș.a.) practică salarizarea diferențiată a cercetătorilor după numărul de citări semnalate în Citation Index. Este imperios ca astfel de publicații să fie constant asigurate de Biblioteca Academiei Române sau de alte biblioteci centrale sau de profil. Ideea de bază este că sunt mai semnificative 100 de citări ale unei singure lucrări decât 100 de lucrări necitate. Aceasta simplifică hotărâtor lungile liste de lucrări care nu au avut un impact în literatura domeniului respectiv.

(c) Tratatele, manualele și monografiile. Cu excepția cazurilor în care sunt reflectate semnificativ propriile contribuții originale, tratatele și monografiile bazate exclusiv pe compilații, au o valoare exclusiv informativă sau didactică; ele nu sunt considerate contribuții științifice. Există numeroși renumiți autori de tratate ajunse "clasice", dar care nu au cerut și nu aparțin nici unei academii de științe. În aceeași categorie intră și cărțile editate, din care o valoare științifică evaluabilă pot avea numai capitolele scrise de editor(i), bineînțeles, dacă sunt bazate pe contribuții originale deja atestate. Nici acest gen de publicatii nu sunt considerate opera științifică, indiferent pe câte volume se întind.

(d) Alte forme ale recunoașterii internaționale. Odată ce producția științifică a unui cercetător este inserată îin mișcarea națională și internațională, se declanșează etape succesive de includere a lui progresivă în familia din ce în ce mai restrânsă a experților mondiali ai acelui domeniu ("recognized world expert in..."). Pe acest lanț de atestări se inseră invitarea ca raportor, chairman sau organizator al unor congrese internaționale, sau ca "Invited Lecturer" sau "Visiting Professor" chemat să-și comunice experiența studenților și corpului didactic și de cercetare de la diverse universități. O etapă și mai avansată este solicitarea drept consultant pentru acordarea de grant-uri străine sau promovări ale unor profesori ori șefi de unități. Evident, recunoașterea atinge etape și mai inalte atunci când propria comunitate

științifică internațională onorează pe cercetătorul respectiv cu distincții și premii științifice de prestigiu. La baza acestei elaborate desfășurări a unei recunoașteri internaționale, nu rareori lipsite de meandre, dar, de regulă, netarată de improvizații, stă inconfundabil valoarea descoperirilor și a conceptelor științifice originale pe care cercetătorul le-a adăugat patrimoniului cunoașterii și culturii universale.

C. PRIMIREA DE TINERI SCIENTIȘTI

În principiu, toată lumea este de acord sau chiar pledează pentru necesitatea "întineririi" Academiei Române, înțelegând prin tinerețea scientiștilor nu atât vărsta lor, ci apartenența lor activă la domeniile de vârf actuale ale științei. Apare ca reconfortantă și generatoare de optimism perspectiva unei îmbinări fertile între scientiști cu responsabilă experiență și contribuții științifice și mai tinerii – dar deseori la fel de calificați – cercetători, făuritorii de azi ai științei. Din păcate (căci nu e vorba de nefericire), până acum includerea în Academia Română a unor tineri cercetători activi a fost modestă, nesemnificativ practicată. Mai mult, datorită prevederilor actualului Statut, cei noi primiți ca "membri corespondenți" (ce semnificație are azi un astfel de termen?) sunt excluși din mecanismul decizional, tocmai ei de la care se așteaptă idei și hotărâri menite să asigure modernizarea și pe plan național și internațional a acestei instituții, față de care mulți au încă serioase rezerve.
În primirea de noi membri, Academia Română ar trebui să fie ca Janus, zeul roman patron al tuturor începuturilor, dar și al tuturor sfârșiturilor – cu o față să privească înapoi spre creatorii de știinta și cultură de ieri, pe care să-i consacre – cu cealaltă față să scruteze înainte pentru a identifica mințile tinere creatoare, capabile să ducă mai departe pe o orbită superioară viitorul acestei Academii.
O grijă deosebită trebuie pusă în aflarea și interesarea în activitatea Academiei a acelor tinere talente infestate de pasiune și putere de creație, dar care prin natura lor sunt modeste, retrase sau poate chiar neîncrezătoare. Ele sunt elita științifică de mâine, care trebuie emulată și protejată. Să nu ne lăsăm intimidați de cei agresivi, de cei care încearcă să forțeze cu zgomot porțile Academiei.
Inclusiv în Academia Română, tinerii scientiști trebuie să fie folosiți cu depline drepturi în impulsionarea de care este atâta nevoie. De altfel, academiile de știință din țările avansate nu au membri corespondenți, o rigidă preluare, din mai vechi și indoielnice surse de inspirație pentru instituțiile din țara noastră. Gradina lui Academus are nevoie de seva proaspată. Acesta este singurul mod prin care rigidizanta homeostazie poate lăsa loc unei reale RHEOSTAZII, care implică mișcare și reînnoire.

D. PROIECTUL NOII LEGI A CERCETĂRII TREBUIE PREZENTAT SPRE DEZBATERE COMUNITĂȚII ȘTIINȚIFICE

Conducerea Academiei Române a participat în mod hotărător la elaborarea Proiectului acestei noi reglementări atât de mult și atâta timp așteptat de Comunitatea Științifică.

Ajuns în faza prefinală, acest proiect trebuie în mod obligatoriu să fie supus dezbaterii prin publicarea lui în presă și trimiterea pentru examinare și sugestii la toate unitățile de cercetare, proiectare și învățământ universitar.

Un material de o astfel de importanță nu trebuie elaborat fără larga consultare a cercetătorilor, dat la aprobare forurilor legislative și apoi Comunitatea Științifică pusă în fața unui fapt împlinit, eventual spunându-i-se pur și simplu: "Acta est fabula!". În mod special este imperios necesar input-ul cercetătorilor tineri pentru că, în fond, ei vor trăi în condițiile stipulate – fără consultarea lor – în acest Regulament.

Păstrăm nădejdea și optimismul că Academia Română își va comemora cei 125 de ani de existență privind înainte printr-un nou mod de a gândi și lucra conform coordonatelor actuale ale vieții științifice, prin îmbunătățirea Statutului și prin îmbogățirea patrimoniului său uman cu cercetători și creatori de valoare.

QUO VADIS, ACADEMIA?
O NOUĂ RUBRICĂ ÎN REVISTA "ACADEMICA"
INIȚIATĂ DE PROF. NICOLAE SIMIONESCU

QUO VADIS, ACADEMIA?

ACAD. NICOLAE SIMIONESCU,
VICEPREȘEDINTE AL ACADEMIEI ROMÂNE
ARTICOL AAPĂRUT ÎN REVISTA "ACADEMICA" NR. 8, 1994

PROMOVAREA UNEI POLITICI MODERNE ÎN ABORDAREA CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE ROMÂNEȘTI

ACȚIUNI VIZÂND ÎMBUNĂTĂȚIREA CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE ÎN ACADEMIA ROMÂNĂ

De ce este necesară îmbunătățirea Cercetării Științifice în Academia Română? Este de notorietate faptul că știința contemporană avansează într-un ritm extrem de alert la care toate comunitățile științifice fac un deosebit efort de a se racorda. Chiar dacă cercetarea științifică (CS) în Academia Română (AR) ar merge excelent, totuși prin natura și scopurile ei în permanentă adaptare, activitatea de cercetare se cere în continuare ameliorată. Din păcate însă, datorită unui complex de motive, Cercetarea în AR nu atinge decât în puține domenii performanțele la care o îndreptățește potențialul intelectual al acestei instituții. Îmbunătățirea CS reclamă unele reconsiderări în mentalitate, management, structura instituțională, mecanisme de finanțare etc. Dacă nu facem un efort să modernizăm și să revitalizăm CS în AR, fără voia noastră, vom fi părtași la pericolul grav al perpetuării și adâncirii decalajelor tehnologice și de competitivitate ale României și prin asta la pierderea identității patrimoniului intelectual românesc în cadrul comunității științifice internaționale.

Modernizarea condițiilor de lucru și asigurarea nivelului de trai corespunzător misiunii sociale a omului de știință, este cel mai bun remediu al "brain-drain-ului", pentru prevenirea căruia, din păcate, nu se întreprinde nimic. Așa cum recent ne-a precizat Banca Mondială, orice potential sprijin financiar extern este condiționat de o reforma semnificativă a CS în care - după părerea experților externi - dealtfel împărtășită și de mulți dintre noi - elementele cheie sunt: coerența intelectuală a rețelei de cercetare proprii; formarea adecvată a noii generații de cercetători; redimensionarea sistemului instituțional; finanțarea cercetării științifice prin sisteme competitive.

Desigur, suntem conștienți că România trece printr-o profundă criză economico-socială, dar în cadrul ei, cea mai gravă este criza științei și culturii, incertitudinea supraviețuirii școlilor și a centrelor de excelență. De aceea, este esențială luarea urgentă de Decizii Politice care să ateste concret că, chiar și într-o perioadă de declin economic, sprijinirea cercetării fundamentale este o datorie morală a Statului.

Investiția constantă în Științele de Bază și în formarea noii generații de scientiști este cea mai lucidă și mai sigură investiție în viitor. În această strategie națională, Academiei Române îi revine responsabilul rol de custode și promotor. Dar, pentru a-și îndeplini convingător această funcție, Academia Română însăși trebuie să-și îmbunătățească și să-și modernizeze propria activitate de cercetare. Realizăm deosebita importanță și responsabilitate a unor astfel de acțiuni, faptul că este vorba de un proces complex, care trebuie să meargă gradat, care va cere timp, imaginație și înțelepciune, cu inerente dificultăți (din afara Academiei, și speram, ceva mai puține din interiorul ei) și că toate măsurile trebuie judicios adaptate specificului diferitelor domenii ale științei. Dar, pe firul continuității valoroaselor nostre tradiții, avem datoria morală să încercăm să asigurăm ascensiunea în spirală ilustrată metaforic de Salieri, dar și să stimulam apariția a cât mai mulți Mozart.

Materialul de față reprezintă o primă formă a unui set de propuneri în acest sens; el a fost aprobat în unanimitate atât de Prezidiu cât și de Adunarea Generală a Academiei Române (10-11 mai 1994). Propunerile rămân însă în continuare deschise sugestiilor tuturor celor interesați în progresul Academiei Române și care doresc să participe activ la realizarea lui. Înscrierea în Grupele de Lucru a unui impresionant număr de colegi relevă o promițătoare angajare în aceste acțiuni a căror finalizare nu se poate face decât printr-un susținut și constructiv efort comun.

MANAGEMENTUL GENERAL

Adăugarea de funcții noi

Alături de funcțiile sale actuale (for suprem de consacrare cultural-științifică, efectuarea de cercetări fundamentale și avansate și rolul social-științific legat de problemele societății românesti), este necesar ca Academia Română să-și adauge trei noi importante activități:

(1) Participarea la învățământul superior, educația în știință a tineretului și formarea cercetătorilor:

(a) Numărul mare de cercetători cu deosebită competență de specialitate din institutele AR, trebuie folosiți în învățământul universitar spre beneficiul studenților. Aceasta se poate realiza prin cumul pe funcții de profesori asociați.

(b) Prin perceperea corectă a rolului covârșitor pe care știința îl va juca în mileniul trei, marile academii (SUA, Japonia, Anglia, etc.) și-au inclus ca obiectiv major educația în știință a populației și îndeosebi a tinerilor începând cu cei din liceu (vezi repetatele pledoarii ale lui Bruce Alberts, noul Președinte al National Academy of Science - USA). Academia Română își poate alcătui relativ curând un program concret în acest sens fiind una dintre acele puține inițiative care nu "costă bani".

(c) Participarea la formarea tinerilor cercetători.

(2) Finanțarea extramurală prin sisteme competitive deschise: Academia Română trebuie să devină una din sursele principale de stimulare a cercetărilor fundamentale de mare relevanță științifică indi¬ferent unde s-ar desfășura acestea. Pentru asta AR urmează să-și includă în bugetul anual o fracțiune destinată finanțării pe baza competiției a unor valoroase propuneri de cercetare venite din universități, institute extra-academice etc. AR are în prezent și în continuare își poate perfecționa mecanismele de evaluare de înaltă obiectivitate și responsabilitate, reclamate de un astfel de sistem de orizont național. Acest mecanism urmează să fie coordonat (selectare de domenii) cu cel folosit de Fondul Român pentru Cercetare proiectat pentru Fundația Română pentru Știință. Numeroase academii folosesc extensiv și cu deosebit succes finanțarea extramurală.

(3) Consultant al organismelor de Stat în Știință și Cultură: După cum se întâmpla în unele țări avansate, AR trebuie să atingă un astfel de prestigiu, încât forurile de Stat să o consulte în orice actiune ce privește direct sau indirect cultură și știință românească. Consultanța ar trebui să se întindă de la elaborarea actelor normative aferente și până la numirea miniștrilor de resort, atașaților culturali-științifici ai ambasadelor și ai centrelor culturale din străinătate.
Principii manageriale majore:
(i) Asigurarea competenței manageriale la diferite niveluri de organizare a CS în AR;
(ii) Descentralizarea institutionala și operațională;
(iii) Selectarea domeniilor și direcțiilor prioritare;
(iv) Evaluarea periodică a institutelor și cercetătorilor;
(v) Finanțarea predominant prin sisteme competitive = cel mai eficient mod de evaluare;
(vi) Protejarea valorilor individuale și a centrelor de excelență;
(vii) Simbioza funcționaă cu universitățile și alte unități de cercetare;
(viii) Internaționalizare prin cooperare.

Scopul final: Cunoaștere, Competență, Excelență.

SISTEMUL INSTITUȚIONAL

SITUAȚIA ACTUALĂ

Prin felul în care a fost tratată de regimul comunist, Academia Română are o istorie unică. În 1948 a fost desființată și înlocuită cu Academia Republicii Socialiste România, organizată după modelul sovietic, în care peste 100 de foști membri au fost excluși și înlocuiți cu unii conducători comuniști de îndoielnică valoare. Demolarea s-a definitivat în anii '60 prin desființarea institutelor de cercetare sau înglobarea lor în sectoarele economico-industriale.

Ca urmare a acestor aberaţii, anul 1989 găseşte în celelalte ţări Centrale şi Est-Europene, inclusiv în Rusia, Academii relativ puternice. În schimb, Academia Română a trebuit refăcută fizic şi moral printr-un prelungit şi deloc simplu proces, al cărui succes este meritul conducerii ei din perioada 1990-1993 şi îndeosebi al preşedintelui Acad. Mihai Drăgănescu. Revine noii conduceri a AR datoria de a duce pe o orbită superioară, modernă, prestaţiile acestei instituţii de mare responsabilitate în prezervarea şi perpetuarea spiritualităţii româneşti. Prezentul plan de acţiuni încearcă să raspună acestei obligaţii morale.

Un alt fapt de remarcat este acela că în ţările amintite, nici înainte şi nici în prezent, nici o Academie nu şi-a transferat institutele în alte reţele. În prezent, organizarea instituţională a diverselor Academii este deosebit de heterogenă, niciuna dintre ele neconstituind un model demn de imitat ca atare. Prin organizarea şi functionarea ei, probabil structura cea mai apropiată de ceea ce se potriveşte Academiei Române, ar fi cea a Societăţii Max-Planck din Germania. Înfiinţată în 1948, ca succesoare directă a Societăţii Kaiser-Wilhelm-Gesellschaft, Societatea Max-Planck (MPG) a avut de la început rolul de a aborda domeniile de cercetare ce nu pot fi în mod adecvat abordate în cadrul universităţilor. Astfel, cele 57 de institute (plus 5 în curs de organizare) nu rivalizează cu universităţile, ci completează activitatea acestora. Mai mult, MPG a organizat recent 28 de grupuri de cercetare pe perioade limitate implantate în universităţi şi institute aparţinând altor sectoare. MPG, cu o autonomie totală, este aproape în totalitate finanţată de la buget, doar o unică fracţie provenind din venituri proprii.

PLAN DE ACŢIUNI (1994-1995)

(a) Definitivarea auditării unităţilor de cercetare ale AR: proiecte, conducerea, cercetătorii, tehnologii, performanţe; propuneri pentru reorganizarea eficientă a reţelei instituţionale a AR. Aceasta acţiune este hotărâtoare pentru viitorul AR. Începu¬tă în 1992, evaluarea unităţilor de cercetare (UC) ale AR a fost imediat continuată încă din februarie 1994 prin difuzarea unui formular complex prin care aproape toate UC au furnizat date necesare procesului de evaluare. Acesta va intra într-o etapă nouă, astfel încât la sfârşitul anului 1994 să poată fi avansate propuneri pentru eventuale reorganizări. Mecanismele de evaluare sunt în concordanţă cu normele internaţionale, auditarea instituţională fiind un punct central al reformei cercetării ştiinţifice din numeroase ţări ale lumii. În ţările foste comuniste, auditarea institutelor academice a dus la închiderea a 30% din institute în Cehia şi la reducerea cu 50% a personalului în alte 59 de institute. Academia Poloneză de Ştiinţe şi-a reorganizat 23 din cele 83 de UC proprii. De remarcat că dintre cele 585 UC din universităţi, numai 20 au obţinut un grad de evaluare la nivelul celor din Academia Poloneză. Academia de Ştiinţe a Ungariei a folosit şi experţi străini în comisiile de evaluare. În general, institutele acesteia sunt conduse şi finantate ca cele ale MPG.

Experţii străini s-au oferit să participe şi în comisiile de evalulare ale AR.
(b) Ocuparea prin concurs a posturilor de director. Întrucât actualii conducători ai UC ai AR au fost "numiţi" în funcţie după 1992, s-a cerut de către un mare număr de academicieni, cât şi de Federaţia Sindicatelor din AR ca toate funcţiile de directori să fie scoase la concurs. Această acţiune, al cărui cadru legal este încă în dezbatere, ar avea potenţial darul de a asigura UC expertiza managerială şi competenţa profesională cea mai calificată, atribute esenţiale pentru succesul reorganizării şi modernizarii CS în AR. În cadrul legislaţiei actuale, AR pe baza autonomiei sale, urmează să-şi definească organizarea acestor concursuri. Odată normalizate unele situaţii, conform practicii internaţionale, toate UC inclusiv conducerea lor (directori, consilii ştiinţifice) urmează a fi reevaluate periodic (4 ani).
(c) Dezvoltarea reţelei de informare şi a băncii de date. Un obiectiv convingător care nu necesită pledoarie sau explicaţii.
(d) Crearea de Grupuri de Cercetare extramurale.

PROIECTE DE CERCETARE: REZULTATE, VALORIFICARE

SITUAŢIA ACTUALĂ

Reflectând larga ei heterogeneitate instituţională, tematica de cercetare a AR are o mare diversitate. Această particularitate plus actualul sistem neconcludent de raportare a rezultatelor, face ca evaluarea performanţelor să fie deosebit de dificilă, iar finanţarea proiectelor "în continuare" să se facă de cele mai multe ori automat, fără nici o relaţie cu rezultatele obţinute (sau nu) în anul precedent. Prin natura lor, proiectele de cercetare sunt generate aproape exclusiv "bottom-up". Din analiza indicilor bibliometrici internaţionali reiese că cercetarea ştiinţifică românească, în ansamblul ei, nu ocupă o poziţie onorabilă (aşa cum ar îndreptăţi-o capacităţile intelectuale ale oamenilor de ştiinţă români).

PLAN DE ACŢIUNI (1994-1995)

Într-o ordine mai mult calendaristică decât a importanţei, sunt necesare un număr de măsuri concrete, ferm şi din timp aplicate în 1994, pentru a pregăti trecerea, din 1995, la un sistem mai eficient de organizare a planului de cercetare al AR.
(a) Elaborarea unui sistem eficient de raportare a rezultatelor si a utilizării fondurilor alocate
(b) Evaluarea "ex-post" a rezultatelor de către Grupuri de Specialişti special alcătuite în acest scop. Aceasta va orienta dacă finanţarea proiectului respectiv se va extinde şi în anul următor.
(c) Selectarea unor domenii prioritare în care AR este şi poate fi şi în continuare performantă la nivel internaţional. Este asteptat ca această acţiune, de mare

responsabilitate, să aibă un impact însemnat asupra structurii instituționale și a sistemelor de finanțare a CS din AR în 1995 și după accea.
Începând cu anul 1995 Planul de Cercetare al AR ar urma să fie constituit din mai multe tipuri de proiecte:
(i) Proiecte Individuale sau Colective finanțate prin granturi competitive;
(ii) Programe Instituționale sau Sectoriale (de interes național sau de domeniu) = finanțare globală de la buget (după evaluare de către grupuri de specialiști);
(iii) Participare la Programele Naționale Prioritare = finantate de Ministerul Cercetării și Tehnologiei;
(iv) Contracte extramurale = finanțate de beneficiari;
(v) Participare la granturile competitive ale Fondului Român pentru Cercetare.

AR trebuie să găsească formulele practice de stimulare a cercetărilor multi- sau interdisciplinare și a proiectelor din ce în ce mai mult susținute în țările avansate, denumite "Cercetări Fundamentale Direcționate" (Basic Targeted Research), un interesant hibrid între cercetarea fundamentală pură și cea aplicativă. Specialiștii din diverse domenii cunosc deja cadrul ideativ și metodologic al unor astfel de studii.

SISTEME DE FINANȚARE

SITUAȚIA ACTUALĂ

În perioada 1993-1994 s-au făcut deja primii pași de trecere de la finanțarea instituționala globală, la finanțarea de programe. Din numeroase motive, deopotrivă obiective și subiective, această aparentă schimbare are un caracter formal, nestimulativ și ineficient fiind în continuare grevat de nivelul extrem de scăzut al fondurilor alocate AR și cercetării fundamentale în general. Teza dupa care marea performanță financiară atinsă a fost aceea de asigurare a salariilor (și acela la un nivel vecin sărăciei) nu onorează nici pe oamenii de știință români și nici pe cei cărora le revine obligația morală de a sprijini corespunzător cercetarea științifică a acestei țări. În această situație agravată continuu și de dotarea tehnico-materială nesatisfăcătoare, trebuiesc căutate justificarea multor emigrări și poziția comparativ joasă pe care o ocupă azi majoritatea ramurilor științei românești. Un alt factor profund dăunător a fost nejustificata blocare a accesului institutelor AR la fondul special de 1%. La valorile la care a fost aprobat, bugetul AR pe 1994, coboară pe o și mai joasă treaptă. Ca exemplu, cele 400 milioane lei acordate pentru cheltuieli de capital (investiții) abia vor putea acoperi cumpărarea unui singur flow cytometer pentru toate cele 65 UC ale AR.

În acelasi timp, în țări vecine precum Cehia, pentru 1994 bugetul pentru știință a fost virtual dublat, iar în Bulgaria, în urma unei greve de tip japonez de două săptămâni, bugetul pentru știință a fost ridicat la 2% din PIB.

Comunitatea ştiinţifică din România priveşte cu consternare la faptul că în structura Bugetului de Stat încă nu există o fracţiune clar definită "Ştiinţă" (destinată în special cercetării fundamentale şi avansate).

În perioada 1994-1995 se va urmări crearea cadrului legislativ-normativ pentru:

(a) Îmbunătăţirea substanţială a salarizării cercetătorilor. Aş începe cu această acţiune datorită caracterului ei urgent şi hotărâtor pentru realizarea întregului plan de reformă a CS. Nimic, sau aproape nimic, din acest plan nu se va putea împlini, dacă făuritorii lui vor fi în continuare frustraţi material şi adeseori şi profesional. Asa cum s-a procedat şi cu alte categorii sociale, faţă de care scientiştii au rămas un paria, trebuie urgent efectuate creşterea categoriei, asigurarea surplusului de venituri din contracte, granturi, cursuri şi, în paralel, intro¬dusă salarizarea diferenţiată în raport cu performanţele ştiinţifice. În străinătate, sunt notorii exemplele de institute unde cercetătorii primesc salariile în raport cu numărul de citări în literatura internaţională.
(b) Restituirea patrimoniului Academei Române. De curând, a fost reînnoită solicitarea înaintată Senatului şi una similara va fi depusă la Camera Deputaţilor. Ambele camere manifestă un încurajator interes şi sprijin pentru rezolvarea corespunzătoare a acestei ilegalităţi a regimului comunist. Deşi se pun mari speranţe în recuperarea acestor importante bunuri, nu este exclus ca în primii ani dupa obţinerea lor, din motive de administrare, recondiţionare etc. beneficiile financiare reale să fie mult sub nivelul celor sperate.
(c) Introducerea sistemului de granturi competitive cu "peer review" cu implicarea în unele domenii şi a unor specialişti străini. În aceasta acţiune AR trebuie să joace rolul forului metodologic. Sistemul menţionat este folosit de câţiva ani în ţările din jur, experienţă cu acest mecanism având ţările cu ştiinţă avansată o vechime de cca. trei decenii.
(d) Participarea AR la înfiinţarea Fondului Român pentru Cercetare (FRC). Propus deja în diferite studii de politica ştiinţei în România, FRC este văzut ca un sistem autonom de granturi competitive individuale pe plan naţional deschis oricărei persoane cu neliniştea creativităţii, indiferent în ce domeniu. Singurul criteriu decisiv pentru finanţarea unor proiecte este potenţiala lor valoare ştiinţifică. Se discută încă dacă cea mai adecvată administrare a FRS ar fi AR sau un organ total autonom de restul reţelelor de cercetare cum este Fundaţia Română pentru Ştiinţă (FRS). Aceasta fundaţie, înfiinţată deja din 1992 sub preşedenţia de onoare a lui George E. Palade, având şi sediu, din motive neclare este încă total ignorată şi nebugetată de autorităţile de Stat.
(e) Introducerea sistemului de finanţare complexă. În acest sistem, bugetul AR ar urma să fie alcatuit din câteva componente corelate, dar cu valori şi destinatii specifice:

(i) bugetul de bază ("core budget") care să asigure salariile, întreţinerea infrastructurilor şi a echipamentelor în dotare, administrarea bunurilor existente;

(ii) fonduri pentru cercetarea propriu-zisă:
- pentru investiții și tehnica nouă,
- pentru materiale consumabile,
- pentru granturi competitive intramurale și extramurale;
(iii) fonduri pentru cooperări interacademice și internationale;
(iv) finanțare indirectă (scutiri de taxe, TVA, etc);

(f) Accesul cercetătorilor AR la fondul special de 1% și la orice sistem de finanțare pe bază competitivă.
(g) Asigurarea dreptului AR de a primi donații și sponsorizări din țară și străinătate.

RESURSELE UMANE

SITUAȚIA ACTUALĂ

O problema de mare complexitate, din care identific doar câteva aspecte ce se cer urgent analizate și rezolvate:
- Lipsa unui Statut al Cercetătorului care să așeze în cadrul adecvat parametrii sociali, materiali și profesionali ai celor ce-și dedică viața științei.
- Deteriorarea condițiilor tehnice de lucru plus salariile insuficiente au efecte negative atât asupra atracției tinerilor spre cariera științifică, cât și a formării viitorilor cercetători.
- Brain-drain-ul a crescut de la 4% în 1990 la 15% în 1993 afectând în special tinerii între 30 și 40 de ani.
- Dintre bursierii plecați pe variate durate de timp mulți nu s-au întors preferând deseori să lucreze pe posturi de tehni¬cieni.

Comparativ cu salariul mediu al unui cercetător echivalat cu cca 100$, în Ungaria salariul mediu este de 300-400$, iar indemnizatia academicienilor de cca 850$. În Bulgaria, după greva cercetătorilor, salariile au crescut cu 15-30%.

PLAN DE ACȚIUNI (1994-1995)

(a) Elaborarea unui program complex de formare a noii generații de cercetători. În cadrul acestuia, este necesar să fie introduse și:
(b) Un nou sistem de burse alcătuite dintr-un fond necesar specializării în străinătate, plus un fond pentru dotarea laboratorului la care urmează să revină în țară. Fără această ultimă componentă, bursierii își vor prelungi indefinit lucrul în străi¬nătate, în mod justificat neacceptând să revină la niște condiții ce nu le permit să performe în cariera aleasă.
(c) Salarizare diferențiată, premii și premieri conform cu realizările științifice.
(d) Legiferarea realizării de venituri adiționale (doctorat, contracte, granturi, cursuri, etc.)
(e) Contracte de angajare pe timp limitat, reînnoite anual. Este o practică extensiv

folosită în alte țări și de curând introdusă și în țările vecine (Cehia, Polonia, Ungaria). Se aplică categoriilor de cercetători inclusiv până la funcția de cercetător principal I angajat nepermanent. Este măsura prin care se asigură continuitatea fluxului și ritmului productivității științifice și disipează starea de spirit a "angajării pe viață".

PARTICIPARE LA ÎNVĂȚĂMANT, EDUCAȚIA ÎN ȘTIINȚĂ ȘI FORMAREA CERCETĂTORILOR

PLAN DE ACȚIUNI (1994-1995)

(a) Ideea de bază este stabilirea unei simbioze multifuncționale cu universitățile. Aceasta ar implica: (i) participarea unor cercetatori la învățământul superior sub forma de profesori asociați, remunerați prin cumul; (ii) efectuarea de către unele cadre didactice a unor norme de cercetare în institutele AR; (iii) organizarea și finanțarea (extramurală) de către AR a unor Grupe de Cercetare pe perioade de timp limitate, implantate în universități; (iv) elaborarea și efectuarea de proiecte de cercetare în comun.
(b) Organizarea de cursuri post-doctorale în domenii de vârf și inter-disciplinare, cu participarea și a unor specialiști din străinătate.
(c) Doctoratul în institutele AR. Instituția noastră trebuie să se implice mai hotărâtor în legiferarea doctoratului în știința care și în prezent nu are încă un cadru legislativ clar, acceptat de toate părțile interesate. Țara noastră este datoare să ofere tinerilor absolvenți cele mai bune condiții existente în prezent pentru desăvârșirea pregătirii lor profesional-științifice, indiferent de apartenența instituțională a locurilor de desfășurare a doctoranturii (universități sau institute de cercetare). În unele domenii, condițiile de mediu științific și dotarea tehnico-materială oferite de unele UC ale AR, sunt mult superioare celor existente în catedrele omoloage. Absolvenții solicită dreptul de a-și efectua doctoratul în astfel de institute: pentru astfel de unități, doctoratul cu frecvență ar fi formula cea mai bună. Întreaga și complexa problemă a organizarii doctoratului, a conducătorilor științifici etc. reclamă o elaborată abordare în cadrul grupului de lucru instituit pentru aceasta acțiune.
(d) Echivalarea funcțiilor, gradelor și nivelurilor de salarizare a cercetătorilor cu cele corespunzătoare din învățământul universitar, necesită inițiativa legislativă adecvată.

COOPERAREA INTERNAȚIONALĂ

SITUAȚIA ACTUALĂ

În general, participarea cercetătorilor români, inclusiv cei din AR la variatele programe de cooperare științifică cu Uniunea Europeană (UE), este încă sub nivelul posibilităților. Diversele materiale publicate asupra cooperării în știință și tehnologie dintre Uniunea Europeană și țările Central și Est-Europene relevă poziția minoră pe

care o ocupă România în cadrul acestor relații. Din datele furnizate de programul PECO 92 se poate constata ca finanțarea prin aceste programe atinge pentru țări ca Ungaria, Cehoslovacia și Polonia valori între 2-3 milioane ECU, în timp ce România nu depășește 0,5 mil. ECU. Numărul de proiecte COST este între 30 și 50 pentru cele trei țări menționate mai sus, România fiind prezentă doar cu 4 (jumătate din numărul de proiecte aprobate Bulgariei sau Sloveniei). În schimb, România are un mare număr de deplasări în vest (361) față de numai 244 ale cercetătorilor maghiari. Acordurile inter-academice sunt absolut necesare și ele trebuie amplificate și diversificate. Dar ca și la cooperarile în cadrul programelor UE, rămâne de gândit problema eficienței acestor participări reflectate final în producția științifică. Înțelegerile de colaborare între persoane s-au dovedit deseori formule mai eficiente decât cele într-un cadru instituțional mai larg organizat.

PLAN DE ACȚIUNI (1994-1995)

(a) Măsuri pentru ameliorarea situațiilor semnalate la "Situația actuală".
(b) Crearea în cadrul Bugetului AR a unui fond special pentru finanțarea colaborărilor internaționale. Un astfel de fond ar urma să fie alocat pe baza competiției și nu acordat automat oricărei cooperări internaționale; multe dintre acestea sunt finanțate de UE.
(c) Crearea în cadrul AR a unui Oficiu pentru Integrare în Programele de Cooperare Europene și Internaționale.
(d) Organizarea în UC ale AR de doctorate și stagii de specializare pentru cercetători străini.
(e) Explorarea posibilităților de creare la Casa Academiei a unui Centru de Congrese.

CADRUL LEGISLATIV

PLAN DE ACȚIUNI (1994-1995)

(a) Participare la elaborarea Legislației privind Cercetarea si Statutul Cercetatorului;
(b) Inițierea Legii pentru restituirea patrimoniului AR;
(c) Cadrul legislativ-normativ pentru constituirea Fondului Român pentru Cercetare;
(d) Elaborarea Regulamentului de Funcționare a unităților de cercetare ale AR;
(e) Îmbunătățirea Statutului Academiei Române și completarea cu un set de Instrucțiuni;
(f) Modificarea instructiunilor AR la Legea Nr. 70/16 iulie 1992 pentru acordarea dreptului unităților de cercetare de a folosi veniturile suplimentare obținute prin contracte, precum și a instrucțiunilor care limitează veniturile din contracte ale cercetătorilor.
Evident, activitatea de cercetare în general va beneficia semnificativ de emiterea

mai rapidă a Legii Fundațiilor, Legii Sponsorizării, Legislația Fundațiilor mixte (ex. Româno-Americane) "Incorporated", normative explicite privind scutirea unităților de cercetare de taxe vamale, TVA, etc.

CALENDARUL ACȚIUNILOR QUO VADIS ACADEMIA?

ORGANIZARE

Colective de lucru: feed-back al secțiilor, filialelor, institutelor și cercetătorilor AR; interacții cu universitățile, academiile de ramură, alte institute; consultări cu comisiile pentru Știință și Învățământ ale Parlamentului.

TERMENE DE REALIZARE

SEMESTRUL II 1994

1. Auditarea unităților de cercetare, a conducerii lor și a cercetătorilor: analiza și propuneri;
2. Ocuparea prin concurs a posturilor de director;
3. Dezvoltarea rețelei de informare + banca de date;
4. Selectarea direcțiilor și domeniilor prioritare;
5. Participarea la înființarea Fondului Român pentru Cercetare;
6. Evaluarea Programelor Sectoriale și Instituționale;
7. Elaborarea unui sistem eficient de raportare a rezultatelor și utilizării fondurilor;
8. Elaborarea Metodologiei Granturilor Competitive și a elaborării prin "peer review" a ofertelor de cercetare;
9. Alcătuirea Bugetului pentru 1995 după sistemul de Finanțare complexă;
10. Măsuri pentru îmbunătățirea veniturilor cercetătorilor;
11. Crearea Oficiului pentru integrare în Programele de Cooperare Europene și internaționale;
12. Inițierea legii pentru restituirea patrimoniului AR.

La aceste acțiuni s-au înscris un număr de 54 membri ai Academiei, directori de institute, cercetători, inserându-și numele pe 91 de poziții de participanți la realizarea celor 12 obiective de mai sus. Acești colegi vor fi curând convocați pentru stabilirea în comun a metodologiilor de lucru, termenelor și coordonatorilor.

Impresionanta amploare a acestui răspuns constituie un revelator indiciu al interesului activ față de mersul mai departe al Academiei Române, o reconfortantă exemplificare a ceea ce spunea Ovidius: "Felix qui, quod amat defendere fortiter audet."

Ulterior, vor fi abordate acțiunile planificate pentru 1995:

SEMESTRUL I 1995

13. Introducerea Granturilor Competitive cu "peer review";
14. Crearea de Grupuri de Cercetare pe perioade limitate în universități și alte institute;

15. Evaluarea ex-post a rezultatelor obținute in 1994;
16. Elaborarea unui program complex de formare a tinerilor cercetători;
17. Intervenții pentru asigurarea cadrului legislativ al echivalării funcțiilor și gradelor, cercetare - învățământ;
18. Explorarea posibilităților de creare la Casa Academiei a unui Centru pentru Congrese;
19. Participarea la elaborarea Statutului Cercetătorului;
20. Modificarea Statutului AR conform cu noile restructurări.

SEMESTRUL II 1995

21. Crearea de burse complexe: specializare în străinătate (1-2 ani), plus dotarea laboratorului;
22. Cursuri post-doctorale.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

World Science Report 1993, Banson Pbl., London 1993.

Projet de loi de finances pour 1994 – Etat de la recherche et du development technologique, Paris, imprimerie Nationale, 1993.

The Max-Planck-Gesellschaft and its institutes – Portrait of a Research Organization, IIIrd edition, Publ.MPG, Munchen, 1993.

Report of the Federal Government on Research 1993. Abridged Version, Federal Ministry for Research and technology, 1993.

Science and Engineering Indicators 1993, National Science Foundation national Science Board, Washington D.C., USA, 1993.

Toward the next century: the state of U.S. science and engineering. National Science Foundation February 1994, Arlington V.A., USA.

Consultation nationale sur les grands objectifs de la recherche francaise – Rapport d'orientation, Imprimerie Nationale, Paris, 1994.

Need for Knowledge and competence in the swedish society at the beginning of the twenty first century. Agenda 2000 – Ministry of Education and Science, Nordstedts Tryckeri AB, Stockholm 1994.

UCSF Science/Health education partnership.A new directions in pre-college science education for NAS. The ASCB Newsletter, 16, No 7, 1993.

Competitiveness for stability. Nature, 364, 571, 1993.

Some lingering controversies confront Bruce Alberts as he succeds Frank press at National Academy helm, The Scientist, 7, No 14, 1, 1993.

Basic research revisited, Nature, 363, 194, 1993.

Bulgarian strike lifts science budget, Nature, 368, 87, 1994.

Slovak science lacks finance, direction… while Czech budget doubles,

Nature, 368, 386, 1994.

Hungary's academy fights to build a new role. Nature, 367, 503, 1994

Philipson, L.Support for the new biology in an integrated Europe. The New Biologist, 2, No 11, 931, 1990

Evaluation of research. A selection of current practices, OCDE Publ. Serv, Paris, 1987.

Latvian research. An international evaluation. The Danish Research Councils, Copenhagen, 1992.

The scientific and technological development system in Hungary, OMIKK, Budapest, 1991.

Russian science gets caught up in struggles over political reform. Nature, 365, 283, 1993.

Can federal agencies preserve science in CIS, Eastern Europe? J.NIH Res, 4, 52, 1992.

Can good science be done in the newly emerging European democracies? The FASEB J., 5, 2125, 1991

After the wall: East-West scientific exchanges escalate. J.NIH Res., 2, 73, 1990.

Funding research. Workbook for governments wishing to establish a granting council (prep. G. Tillman). The World Bank, Washington D.C., 1992

Czechs revise policy on research funding: aim for a more Western approach. Nature, 361, 104, 1993.

Networks of centers of excellence. Competition announcement, Inter – Council program Directorate, Innovaction, Canada, 1992.

Cherfas, J. Peer review: software for hard choices. Science 250, 367, 1990.

M.Khan et.al. The national Institutes of Health is going high-tech in peer review. FASEB J., 6, 2385, 1992.

Gershon, E.S. Gillin, J.C. What the intramural and extramural systems of federally funded biomedical research can learn from each other. J. NIH Res 4, 20, 1992.

Sharp. P. The crisis in funding: a time for decisions. Cell, 62, 839, 1990.

Funding: new ideas for tight money. J. NIH Res. 5, 31, 1993.

Proposal for a Council Decision concerning the fourth framework programme of the EEC activities in the field of research, technological development and demonstration (1994-1998), COM (93) 276 final, Brussels, 1993.

Direcții principale ale reformei activității de cercetare științifică și dezvoltare tehnologică (C and D) în România. Studiu de sinteză redactat de N. Simionescu, Gh. Zaman, A. Toia și S. Sandu, București, 1993.

PRINCIPII GENERALE ALE STRATEGIEI REFORMEI CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE ȘI DEZVOLTĂRII TEHNOLOGICE ÎN ROMÂNIA

PRINCIPII GENERALE ALE STRATEGIEI REFORMEI CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE ȘI DEZVOLTĂRII TEHNOLOGICE ÎN ROMÂNIA

ACAD. NICOLAE SIMIONESCU

PREMIZE ȘI OBIECTIVE

Tranziția României la sistemul democratic al statului de drept și la o economie de piață presupune transformarea activității de cercetare științifică și dezvoltare tehnologică (C&D) într-o componentă primordială, cu statut de invariant, al întregului proces de reformă și de dezvoltare economico-socială și culturală. Implicarea directă a activității C&D în procesul reformei la nivel macro- și microeconomic este o condiție obligatorie, nerespectarea ei având ca efect perpetuarea și adâncirea în ritm accelerat a decalajelor tehnologice și de competitivitate în defavoarea României, cu impact negativ asupra statutului României în evoluțiile care vor avea loc pe plan regional, european și mondial.

Cercetarea științifică și dezvoltarea tehnologică reprezintă o ramură strategică prioritară, întrucât:
(i) participă direct la elaborarea programelor de restructurare a ramurilor, sectoarelor și întreprinderilor din economie; activitatea concretă de retehnologizare și modernizare a economiei nu poate fi realizată fără acordul concret și direct al activității C&D;
(ii) contribuie direct, prin programe de interes național, la îmbunătățirea calității vieții în România;
(iii) conferă identitate patrimoniului intelectual al României în cadrul comunității științifice internaționale;
(iv) asigură creșterea performanțelor și competitivității unor întreprinderi, tehnologii și produse românești, în vederea pătrunderii și consolidării acestora pe piața națională și internațională;
(v) sprijină procesul de creare, menținere și dezvoltare pe baze competitive, la nivel tehnologic ridicat, a întreprinderilor mici și mijlocii, orientate spre producție; contribuie la creșterea nivelului general de cunoștințe, la schimbarea mentalităților și fundamentarea deciziei la diferite niveluri.

Realizarea rolului de factor motor pe care îl are activitatea de C&D în economie, implică emiterea unor decizii de principiu însoțite de măsuri concrete corespunzătoare:
(i) Decizia politică explicită, la nivelul Guvernului și a altor factori responsabili, privind cunoașterea și atribuirea rolului vital pe care îl are activitatea C&D ca problemă de stat de interes național. Sub un anumit nivel de implicare directă a Statului în

elaborarea, coordonarea și realizarea unor Programe de cercetare-dezvoltare de interes național, precum și în asigurarea unui anumit nivel de finanțare din fonduri publice a activității C&D, nu se poate vorbi de o politică guvernamentală reală în domeniul științei și tehnologiei.
(ii) Decizia economică care să asigure finanțarea adecvată a diverselor tipuri de activitate de C&D (cercetare fundamentală, direcțională, aplicativă) într-un cadru instituțional diferențiat, realizată printr-un sistem de finanțare care va trebui să asigure: creșterea și consolidarea surselor publice de finanțare a C&D; diminuarea decalajelor existente și participarea efectivă a României în competiția științifică, tehnologică și economică pe plan mondial; dezvoltarea depinde direct de creșterea treptată, semnificativă, a volumului real al fondurilor de C&D; pluralismul și diversificarea surselor și mecanismelor de finanțare directă și indirectă a C&D; stimularea cererii de C&D; susținerea ciclului cercetare științifică-dezvoltare tehnologică în ansamblul său, până la aplicare; participarea întreprinderilor la finanțarea proiectelor de C&D.
(iii) Deciziile manageriale, la nivelul MCT, ale Academiei Române, ale ministerelor și departamentelor, ale institutelor de cercetare-dezvoltare și ale agenților economici, de realizare a reformei pe plan sectorial și instituțional privind structurile și mecanismele de elaborare, finanțare, coordonare și realizare a programelor și proiectelor de cercetare; restructurările vor asigura și măsurile necesare de protecție socială.

Implicarea activă și constantă a comunității științifice în elaborarea și coordonarea strategiei naționale, sectoriale și instituționale. Includerea în organele de coordonare pe baze riguros științific-profesionale a specialiștilor cu recunoscută expertiză în managementul și efectuarea cercetării științifice; perfecționarea sistemului de promovare a valorilor intelectuale.

Modelul spre care se tinde prin Reforma C&D în România trebuie să se bazeze, cu suplețea necesară, pe acele experiențe pozitive din alte țări care au elemente comune compatibile cu tradiția, realitățile și obiectivele reformei economico-sociale și cultural-științifice din țara noastră.

Obiectivul global al Refomei C&D este sporirea eficienței economico-sociale și creșterea contribuției românești la dezvoltarea științei și culturii românești și mondiale.

ORIENTĂRI ALE REFORMEI C&D ÎN ROMÂNIA

GENERAL

(1) Datorită complexității, profunzimii și multiplelor sale implicații, se anticipează că reforma C&D va fi un proces relativ lent, treptat, desfășurat pe mai multe orizonturi de timp și obiective sinergice cu etapele tranziției la sistemul democratic al statului

de drept și la economia de piață în România.
(2) Măsurile de reformă trebuiesc bazate pe principiul păstrării, dezvoltării și perfecționării componentelor valoroase din C&D românească, și a completării lor cu noi structuri și mecanisme care să corespundă cerințelor și standardelor actuale ale științei și tehnologiilor performante.

MANAGEMENTUL

(1) Descentralizarea instituțională și funcțională la nivelul necesar pentru asigurarea autonomiei și flexibilității unităților și echipelor de C&D care să permită alegerea celor mai adecvate forme de organizare, programare și realizare a activității de C&D. Descentralizarea procesului decizional și sporirea autonomiei funcționale trebuie obligatoriu dublate de responsabilitatea corespunză-toare față de acțiunile asumate de diverși factori implicați în selectarea programelor, folosirea resurselor financiare și raportarea periodică a rezultatelor obținute. Autonomia și libertatea academică, în sensul lor cel mai larg, funcționează în condițiile creării unui sistem instituțional coerent, capabil să asigure coordonarea și realizarea finanțării și evaluării rezultatelor C&D în concordanță cu obiectivele strategice și prioritățile Programelor de cercetare de interes național, sectorial, instituțional. Acest sistem trebuie să aibă un înalt prestigiu în fața comunității științifice.
(2) Reducerea substanțială a birocrației în diversele etape ale procesului de C&D.
(3) Evaluarea în condiții de perfectă responsabilitate și imparțialitate deopotrivă a programelor de cercetare propuse "top-down" cât și a celor "bottom-up", sugerate de cercetători sau grupuri.
(4) Raportul sector public-sector privat al sistemului C&D trebuie stabilit pe baza principiilor competiției și cooperării specifice pieței științei și nu prin măsuri administrative.
(5) Utilizarea de către consiliile în acest scop stabilite la nivelul Academiei Române, Ministerului Cercetării și Tehnologiei, Ministerului Învățământului, Fondului Român pentru Știință, a procedurilor de evaluare ex-ante, interimar și ex-post și a principiului competitivității, în finanțarea programelor și proiectelor de cercetare propuse de diverse instituții sau persoane.
(6) Stimularea și sprijinirea concretă a cooperării și interacției componentelor sistemului C&D.
(7) Stimularea transferului tehnologic și difuzarea cunoștințelor noi la nivel sectorial, interregional și internațional.
(8) Multiplicarea, diversificarea și flexibilitatea formelor de organizare, funcționare și finanțare ale sistemului C&D în vederea unei mai bune concordanțe dintre cererea și oferta de C&D, și a intensificării legăturilor dintre cercetarea academică, universitară, tehnologică și industrie.

STRUCTURA INSTITUȚIONALĂ

(1) Activitățile de C&D se desfășoară în principal în trei sisteme instituționale: Academia Română, Ministerul Cercetării și Tehnologiei (MCT) și Ministerul Învățământului, care au autonomie în elaborarea, coordonarea și finanțarea propriilor programe și proiecte de cercetare. Fiecare din cele trei sisteme are un organism propriu de coordonare a C&D: Academia Română = Prezidiul și Secțiile de Specialitate însumând 177 de specialiști, membrii ai Academiei Române; MCT = Colegiul Național Consultativ pentru Cercetare și Dezvoltare; Ministerul Învățământului = Consiliul Cercetării Universitare.
(2) Institutele Academiei Române desfășoară activități predominant în domeniul cercetărilor fundamentale și direcționale, institutele MCT îndeosebi în aria cercetărilor aplicative și de dezvoltare tehnologică, iar Ministerul Învățământului în variate domenii fundamentale, aplicative și interdisciplinare.
(3) Concomitent, cele 3 principale sisteme de C&D colaborează în definirea strategiei C&D pe plan național, formularea Programelor Naționale, formarea cercetătorilor, contribuind conform cu specificul, expertiza și rolul lor, la elaborarea și realizarea politicii de stat în domeniul C&D.
(4) Pentru creșterea performanțelor activităților de C&D și a eficienței investițiilor publice în acestea, este absolut necesară auditarea și evaluarea periodică a unităților de cercetare, proiectelor, conducerii institutelor și cercetătorilor.
(5) Pentru ameliorarea sau eliminarea unor disfuncții ale actualului sistem instituțional al C&D, este necesară crearea de noi instituții și organisme de interes național sau sectorial (ex. Fondul Român pentru Știință, Agenția Națională de Transfer Tehnologic ș.a.). Academia Română propune înființarea Comitetului Consultativ pentru Cercetare și Dezvoltare, organism format din specialiști de înaltă valoare în domeniul managementului în cercetare și în cercetarea propriu-zisă. Acest comitet interdepartamental propus și în materialul final al Proiectului Băncii Mondiale (ianuarie 1994) ar avea drept scop elaborarea materialelor pe baza cărora Consiliul Interministerial pentru Știință și Tehnologie să formuleze propunerile înaintate Guvernului.
(6) Sprijin financiar și asistență pentru dezvoltarea în continuare a "centrelor de excelență" din România care sunt recunoscute ca atare pe plan internațional și crearea unor noi astfel de unități de cercetare în care țara noastră are evidente avantaje comparative și perspective.

FINANȚAREA

Finanțarea activității C&D trebuie să se bazeze pe:

(1) creșterea substanțială a fondurilor alocate de la bugetul de stat;
(2) cofinanțarea de către industrie și agenții comerciali interesați, îndeosebi a

cercetărilor aplicative și de dezvoltare tehnologică;
(3) aplicarea sistemelor competitive, de tip "grant";
(4) stimularea asigurării și prin finanțarea indirectă a finanțării C&D, astfel încât ponderea fondurilor private să crească pe măsura consolidării mecanismelor de piață;
(5) obținerea de asistență financiară internațională prin cooperare științifică în proiecte și programe comune.

RESURSELE UMANE

În această componentă cheie a C&D, reforma prevede:

(1) Îmbunătățirea substanțială a salariilor și altor venituri ale cercetătorilor, cu posibil efect pozitiv și asupra emigrării oamenilor de valoare.
(2) Elaborarea unor politici de încadrare, formare/perfecționare, selecție, evaluare a cadrelor și a managerilor de C&D, care să urmărească asigurarea funcționării unităților C&D cu un potențial uman de înaltă pregătire profesională, respectiv managerială, în scopul promovării competenței și excelenței.
(3) Elaborarea unei politici în domeniul mobilității personalului, asociată cu o politică de protecție socială, în vederea asigurării reorientării personalului C&D în corelare cu necesitățile economiei naționale, cu calificarea și opțiunile oamenilor.
(4) Încadrarea prin concurs a directorilor unităților de cercetare și reevaluarea lor la 4 ani.
(5) Bursele de specializare în străinătate a tinerilor cercetători să fie sistematic dublate de investițiile financiare adecvate pentru asigurarea la nivelul standardelor naționale a condițiilor tehnice de lucru la unitatea de cercetare unde urmează să revină.

REFORMA ÎN DOMENIUL COOPERĂRII ȘTIINȚIFICE ȘI TEHNICE INTERNAȚIONALE

Aceasta urmărește elaborarea și aplicarea unei strategii concretizate într-un program de acțiuni orientat activ spre intensificarea cooperării științifice internaționale și integrarea în programele europene de C&D.

REFORMA SISTEMULUI LEGISLATIV C&D

Aceasta are ca obiective principale:

(1) perfecționarea cadrului legislativ existent, prin introducerea de noi acte normative, reglementări, metodologii necesare aplicării și susținerii măsurilor de reformă în domeniul instituțional C&D, al managementului C&D, al sistemului financiar C&D, al resurselor umane, al cooperării științifice și tehnice internaționale etc.;

2) armonizarea legislației românești în domeniul C&D cu cea aplicată în țările dezvoltate.

INVARIANȚII REFORMEI C&D ÎN ROMÂNIA

Principalele obiective strategice de ridicare a competitivității economiei naționale și dezvoltarea culturii, urmărite prin reforma activității de cercetare științifică și dezvoltare tehnologică sunt:

(1) pe termen scurt: consolidarea legăturilor cercetare - dezvoltare - societate în general, și în mod special cercetare - dezvoltare - economie, în scopul accelerării procesului de restructurare în economie și a relansării producției și serviciilor, cât și al îmbogățirii continue a contribuțiilor românești la știința și cultura universală;
(2) pe termen mediu: integrarea efectivă a României în fluxurile tehnologice internaționale, în scopul modernizării economiei prin asimilarea unor tehnologii avansate și a sistemelor performante de asigurare a calității;
(3) pe termen lung: obținerea unor rezultate C&D competitive pe plan mondial și atingerea stadiului de independență tehnologică în unele domenii de vârf.

Concretizarea acestor obiective se realizează prin ansamblul măsurilor de reformă orientate spre perfecționarea componentelor sistemului și activității C&D, măsuri care sunt redate mai în amănunt în materialul însoțitor acestei note de prezentare a principiilor generale propuse a sta la baza reformei C&D în România.

FINANȚAREA COMPETITIVĂ A CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE FUNDAMENTALE ȘI DIRECȚIONATE PRIN GRANTURILE ACADEMIEI ROMÂNE

Pentru a-și îndeplini rolul său de instituție științifică și culturală de vocație națională, Academia Română a inițiat un plan de măsuri menite să stimuleze cercetarea științifică de performanțe deosebite și să promoveze excelența în știință. În cadrul acestor măsuri, Academia Română va institui începând cu anul 1995 o finanțare competitivă a cercetării științifice prin Granturile Academiei Române (GAR).

Sistemul GAR introduce principiile stimulative ale liberei competiții în știință care a constituit și reprezintă și în prezent una dintre cheile remarcabilelor progrese științifice și tehnologice obținute în țările avansate; el va funcționa concomitent cu finanțarea pe programe și proiecte în cadrul instituțional actual al Academiei Române. În vederea aplicării încă din 1995 a acestui sistem de finanțare a fost constituit Consiliul Granturilor Academiei și a fost aprobat Regulamentul de acordare a acestor granturi care asigură mecanismele adecvate pentru selectarea celor mai valoroase proiecte de cercetare, apte să conducă la rezultate competitive pe plan mondial, cu important

impact în dezvoltarea economico-socială a ştiinţei şi culturii în ţara noastră.

Sistemul de finanţare prin GAR are următoarele caracteristici:

(a) Sistemul este accesibil tuturor persoanelor fizice şi juridice din ţară independent de apartenenţa lor administrativă (universităţi, academii, ministere ş.a.)
(b) Procedura de evaluare a cererilor de grant se desfăşoară într-o deplină transparenţă
(c) Temele de cercetare propuse pentru finanţare prin GAR pot fi iniţiate prin cele două mecanisme larg folosite în ţările avansate: (i) teme propuse de către persoane fizice sau juridice; (ii) proiecte sau programe de interes naţional formulate de către Academia Română în domenii pe care aceasta le consideră prioritare şi pentru a căror rezolvare invită cercetători şi colective să supună spre selecţie teme adecvate.
(d) Sistemul GAR finanţează de asemenea şi o serie de acţiuni ajutătoare proiectelor de cercetare: calificarea tinerilor cercetători, organizarea de infrastructuri de înaltă tehnologie, reţele de informatică, colaborări internaţionale etc.
(e) Propunerile de teme de cercetare şi activităţi corelate vor fi examinate şi selecţionate de Comisii de Evaluare alcătuite din specialişti recunoscuţi din ţară şi străinătate, avându-se în vedere ca principale criterii de selecţie meritul ştiinţific, originalitatea şi contribuţia la progresul ştiinţei şi la soluţionarea unor probleme ale vieţii sociale şi economice în general şi ale ale României în special.
(f) Continuarea de la un an la altul a finanţării este riguros condiţionată de rezultatele obţinute evaluate periodic de comisiile de specialişti ai GAR.

Funcţionarea sistemului granturilor Academiei Române este condiţionată de constituirea unui fond distinct şi suplimentar la bugetul de venituri şi cheltuieli al Academiei Române, provenit din diferite surse, atât bugetare, cât şi extrabugetare (donaţii, sponsorizări etc.).Potrivit estimărilor, fondul necesar desfăşurării etapei iniţiale a finanţării competitive prin acordare de granturi se ridică la 7.000 mil. lei, în care partea cea mai importantă (circa 90%) se solicită de la Bugetul de Stat pe anul 1995. Faţă de cele de mai sus, pentru susţinerea activităţii de cercetare ştiinţifică prin granturi, este necesar ca în proiectul legii pentru aprobarea Bugetului de Stat pe anul 1995 să fie prevăzută suma de 7.000 mil. lei în mod distinct pentru Academia Română, pe lângă sumele prevăzute pentru finanţarea Academiei Române şi a institutelor sale.

PROGRAME DE INTERES NAŢIONAL ALE ACADEMIEI ROMÂNE:

MOTIVAŢIILE TINERETULUI ROMÂN ÎN PERIOADA ACTUALĂ

Proiectul urmează să identifice problemele actuale ale tineretului român şi, totodată, să analizeze măsura în care societatea poate răspunde cerinţelor tineretului şi modalităţile în care urmează a se concretiza acest răspuns.

ROMÂNIA 2020
Pornind de la progresele științei și tehnologiei, proiectul urmărește a le folosi în soluționarea problemelor economice și sociale cu care se confruntă societatea românească.

DICȚIONARUL TEZAUR AL LIMBII ROMÂNE
Prin proiect se urmărește ca această acțiune de tezaurizare și evidență a limbii române să fie încheiată până în anul 2000 și va cuprinde 37 volume, din care 27 sunt tipărite.

DICȚIONARUL GENERAL AL LITERATURII ROMÂNE
În acest dicționar, indispensabil oricărei culturi, va fi cuprinsă întreaga literatură română, de la începuturi până la anul 1995, inclusiv scriitorii din ținuturi românești din afara granițelor și din diaspora, el urmând a fi realizat în 4-5 volume.

ISTORIA ROMÂNILOR
Proiectul are în vedere realizarea în zece volume a istoriei românilor, care va înfățișa nivelul actual al istoriografiei naționale, corelat problematicii mondiale și care răspunde unor necesități stringente de cunoaștere de sine ale societății românești.

CONTRIBUȚIA ACADEMIEI ROMÂNE LA PROTEJAREA INTEGRITĂȚII MEDIULUI "ZIUA MONDIALĂ A MEDIULUI" - BUCUREȘTI, 5 IUNIE 1994

În decursul existenței sale Academia Română s-a implicat în numeroase aspecte conceptuale sau concrete ale protecției mediului înconjurător. Să amintim doar opera lui Grigore Antipa, fondatorul Școlii românești de ecologie și remarcabila sa contribuție la gospodărirea rațională a Deltei și zonei inundabile a Dunării. De asemenea, aportul lui Emil Racoviță la fundamentarea principiilor și normelor ce stau la baza ocrotirii naturii. Străduințele sale, alături de cele ale eminentului om de știință Alexandru Borza, au dus la promulgarea primei legi de ocrotirea naturii și înființarea în 1930 a "Comisiunea pentru Ocrotirea Monumentelor Naturii". Pe baza unor temeinice cercetări științifice, activitatea acestei comisii a condus la statuarea primelor rezervații naturale (1932) și a primului parc național, cel din Munții Retezat (1935). După anul 1954, de când această comisie funcționează sub auspiciile Academiei, numărul rezervațiilor naturale a crescut de la 37 la peste 620, conservând eșantioane reprezentative ale ecosistemelor naturale, martori din evoluția scoarței terestre, fenomene naturale sau situri cu impotanță științifică deosebită.

Institutul de Biologie al Academiei, în colaborare cu Institutul de Geografie și cu alte institute au finalizat recent studiul "Diferențierea ecoregiunilor de pe teritoriul

României", în vederea evaluării stării acestora și Studii privind dezvoltarea rețelei de parcuri naționale. Prin finanțarea de către Comunitatea Europeană, un colectiv coordonat de Academia Română prin Institutul de Biologie-București abordează în prezent extinderea și completarea proiectului CORINE (Coordination of information on the environment) privind Biotipii în România. Tot în acest an debutează importante programe privind:
(a) cercetări vizând cunoașterea biodiversității în profil teritorial și dezvoltarea rețelei ariilor protejate;
(b) cercetări taxonomice privind fauna României și conexiunile ei pe plan euroasiatic și mondial;
(c) colaborare la programul "Identificarea mecanismelor productivității și evaluarea capacității productive a ecosistemelor din zona inundabilă a Dunării și Delta Dunării", coordonat de Facultatea de Biologie a Universității București.

În anul în curs, Institutul de Geografie al Academiei își concentrează activitatea pe numeroase programe legate de protecția mediului, dintre care menționăm: (i) Schimbări ale structurilor fizice și economico-geografice din Valea Dunării românesti; (ii) Studiul condițiilor geografice actuale din Delta Dunării și de pe litoralul românesc al Mării Negre în scopul protecției ecosistemelor naturale și a unei dezvoltări durabile; (iii) Cauzele și consecințele hazardelor naturale; (iv) Atlasul geografic al mediului.

În timp ce aceste activități de protecția mediului continuă în diverse structuri organizatorice din țara noastră, pe Plan Internațional, s-au impus puternic trei idei:
(1) Deteriorarea mediului și capitalului natural la scară regională și globală au atins asemenea dimensiuni încât plasează dezvoltarea economico-socială din următoarele decenii într-o zonă extrem de critică;
(2) Stoparea deteriorării mediului și recuperarea capitalului natural, asociate cu un riguros control demografic, sunt elemente cheie în dezvoltarea mai departe a societății umane;
(3) Realizarea deziderateloe enunțate mai sus este strict condiționată de elaborarea unei strategii și înființarea unor structuri operaționale complexe naționale, regionale și internaționale.

În lumina acestor noi concepte, Academia Română a înțeles necesitatea de a-și depăși limitele sferei sale tradiționale de activitate și a contribui direct la asigurarea transferului unor rezultate științifice în planurile de acțiune emanate din strategiile enumerate anterior.
Astfel, COMISIA DE ECOLOGIE A ACADEMIEI ROMÂNE a acționat în sensul: (i) promovării și susținerii proiectelor care au vizat evaluarea stării structurii ecologice (ecoregiuni) la nivel național; (ii) evaluării informației existente privind diversitatea specifică/taxonomică; (iii) constituirii rețelei naționale de colective/centre care au expertiză și pot asigura derularea proiectelor de cercetare care se dezvoltă (proces

dificil și lent); (iv) integrării în rețele de cercetare regională (ERMAS, DIVERSITAS, CORINE etc.).

Comisia de ecologie își propune ca obiective de prezent și perspectivă imediată a următoarelor priorități: Dezvoltarea și promovarea proiectelor de cercetare a capacității productive și de suport a categoriilor de sisteme ecologice de pe teritoriul țării; Facilitarea integrării în rețele internaționale de cercetare; Implicarea comunității academice în procesul de elaborare a strategiei naționale de "conservare a biodiversității" și de susținere științifică a acțiunilor la nivel național și european de conservare a biodiversitații și de menținere a integrității capitalului natural.

În același timp, un alt organism creat de Academia Română în anul 1991, Comitetul Național Român pentru Programul Internațional "Geosferă-Biosferă" își concentrează activitatea pe descrierea și interpretarea interacțiunii proceselor fizice, chimice și biologice care reglează Sistemul Terestru Global, precum și implicarea specialiștilor români în Programul internațional ENRICH (European Network for Research in Global Change).

Prin aceste acțiuni și prin altele ce vor urma, Academia Română înțelege să se alăture din ce în ce mai mult efortului cercetării științifice menită să sporească continuu baza de cunoaștere absolut necesară adoptării unor decizii corecte și eficiente pe termen lung, prin care România să-și aducă o semnificativă contribuție la entropia reciprocă a interacției omului cu mediul natural căruia îi aparține.

QUO VADIS, ACADEMIA?
FINANȚAREA COMPETITIVĂ A CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE PRIN GRANTURILE ACADEMIEI ROMÂNE

QUO VADIS, ACADEMIA ?
FINANȚAREA COMPETITIVĂ A CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE PRIN GRANTURILE ACADEMIEI ROMÂNE

PUBLICAT ÎN ACADEMICA NR. 2, 1994

CUVÂNT INAINTE

Cu intenția de a stimula și orienta pe orbitele științei contemporane cercetarea științifică din Academia Română, a fost elaborat un plan pe măsuri care a fost aprobat de Adunarea Generală a Academiei Române din 11 mai 1994. O sinteză a acestor măsuri a fost publicată în "Academica" IV/8(44), iunie 1994, pg.15-18. Reacția imediată a membrilor Academiei a fost remarcabilă: peste 50 de colegi s-au oferit să participe la cele 13 acțiuni preconizate pentru care au fost înregistrate peste 90 de înscrieri. Conform calendarului stabilit pentru anul în curs, 7 dintre aceste acțiuni au început a fi elaborate de colective formate atat din membri ai Academiei, cât și de cercetători și conducători ai unor institute de cercetare. Dintre aceste acțiuni, cea care a ajuns la un avansat stadiu de concretizare este introducerea unui sistem de "Finanțare Competitivă a Cercetării Științifice prin Granturile Academiei Române". Aceasta acțiune, prezentată și aprobată de Adunarea Generală a Academiei la 8 noiembrie 1994, a făcut obiectul Deciziei nr.852 din 26.XI.1994 a conducerii instituției noastre. Prin ea se validează de asemeni componența Consiliului pentru Granturile Academiei Române și Regulamentul de organizare și funcționare a acestui nou sistem de finanțare a cercetării. Aceste materiale sunt redate mai jos. Cu prilejul publicării lor, deschidem o nouă rubrică în "Academica", purtând motto-ul articolului inițial asupra reformei cercetării în Academie "Quo vadis, Academia?". În cadrul acestei rubrici, pe de o parte vom informa cititorii asupra progreselor realizate și a problemelor întâmpinate în diversele acțiuni de restructurare a cercetării științifice în rețeaua noastră instituțională, iar, pe de altă parte invităm pe toți cei interesați să-și exprime puncte de vedere și propuneri constructive menite să asigure realizarea în cei mai adecvați parametri a acestor acțiuni.

FINANȚAREA COMPETITIVĂ A CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE PRIN GRANTURILE ACADEMIEI ROMÂNE

Acad. Nicolae Simionescu, Vicepreședinte al Academiei Române,
Dr. Gheorghe Zaman, Directorul Institutului Național de Economie
Dr. Steliana Sandu, cercetător științific principal la Institutul Național de Economie
Stelian Beldescu, Secretar Științific

Un aparent paradox al lumii contemporane ar opune impresionantele succese ale științei unei relative dar general resimțite limitări ale resurselor financiare alocate cercetării științifice și dezvoltării tehnologice. Această disjuncție a atins dimensiuni îngrijorătoare îndeosebi în domeniul științelor fundamentale, afectate în acest sens chiar și în unele țări dezvoltate. Astfel de aprecieri apar elocvent în majoritatea literaturii recente de politica științei inclusiv în documente oficiale de analiză cum este recentul studiu "Știința în interesul național" emis de Oficiul Casei Albe pentru Politica Științei și Tehnologiei (OSTP).

Deși este recunoscută capacitatea cercetării de a oferi o frontieră nesfârșită, știința în sine este apreciată drept o "nelimitată resursă pentru resursele limitate". Factorii care au generat disjuncția amintită sunt extrem de complecși. Printre aceștia: distanța pe de o parte între numărul crescând de tineri scientiști de excelentă calificare, diversitatea și sofisticarea tehnologiilor de lucru și pe de altă parte fondurile pe care statul le poate aloca științei în condițiile în care alte priorități de natură socială, militară, sănătate publică etc. se impun guvernelor. În această conjunctură, competiția între cercetători pentru fonduri a devenit o formulă necesară, deși larg discomfortantă pentru cei care, în loc să se dedice complet minunatei aventuri pentru cunoaștere, trebuie să-și investească 60-70% din timp scrierii de cereri de granturi. Statisticile arată că în țările dezvoltate, deși fondurile alocate cercetării marchează anual o creștere semnificativă, aceasta este practic anulată de fenomenul inflaționist.

Și totuși, în pofida acestor dificultăți a unei ere "de tranziție" marcată de consistența unei științe de succes cu scientiști nemulțumiți și neliniștiți, progresele în cercetare, tehnologie și dezvoltare continuă să schimbe radical existența umană. Pe fondul disputat al necesarului incomplet satisfăcut al costurilor pentru cercetare, alocarea limitatelor resurse bugetare disponibile continuă - în marea majoritate a țărilor - să se efectueze prin sistemul granturilor competitive atât pentru cercetarea propriu-zisă cât și pentru accesul la formarea ca specialist în știință. Deși criticată de unii, finanțarea prin competiție este în continuare considerată o formulă, deși nu ideală, totuși cea mai rezonabilă. Într-un fel sentimentul este comparabil cu cel asupra democrației pe care Winston Churchill în maniera sa inegalabilă o definea drept "regimul cel mai puțin bun din câte pot exista, cu excepția tuturor celorlalte".

Măsurile de ameliorare a crizei finanțării științei (în special a celei fundamentale) și tehnologiei variază de la o țară la alta în funcție de un complex de parametrii printre care: nivelul producției economice, gradul de dezvoltare a sectorului particular, nivelul educației generale în știință, capacitatea locală de a produce sau asimila tehnologia înaltă, prioritățile naționale etc. În ceea ce privește sursele și mecanismele de finanțare, în țările din Europa Centrală (în aceasta includem și arbitrara subdiviziune a "Europei de Est") sistemul bugetelor globale alocate institutelor de cercetare este progresiv asociat cu finanțarea prin competiție a proiectelor individuale sau de grup.

Temele sunt generate printr-unul din cunoscutele formule: "bottom-up" (subiecte propuse de indivizi) și "top-down" (programe elaborate de consilii de experți pentru rezolvarea cărora sunt invitați cercetători din indiferent ce apartenență administrativă). Ambele sisteme sunt larg accesibile, fondurile se alocă exclusiv prin competiție între propuneri evaluate "ex-ante" și apoi și "ex-post" de către comisii de specialiști într-o procedură de totală transparență. Asemenea țărilor avansate, care folosesc granturile competitive de câteva decenii, majoritatea țărilor din jurul nostru aplică deja de un număr de ani acest sistem.

În România, finanțarea cercetării științifice pe bază competitivă este o idee relativ recentă care a fost experimentată doar în câteva domenii ca biotehnologia (inițiată de Comitetul Național pentru Biotehnologie Avansată al Academiei Române și Ministerul Cercetării și Tehnologiei) și informatica. Judecat prin numărul mare al cererilor de grant primite și prin exigența și probitatea comisiilor de evaluare, cele două acțiuni au consituit un succes. În cazul biotehnologiei însă, rezultatul practic a fost în unele cazuri neadecvat datorită scurtcircuitării unor decizii ale comisiilor de specialiști. De remarcat atitudinea emancipată a Curții de Conturi care a cerut ca finanțarea proiectelor să se facă numai după prealabila lor evaluare de către comisii de specialiști în domeniul respectiv. Până acum în țara noastră finanțarea cercetării științifice s-a făcut predominant prin diverse variante de buget global dat unor instituții și prin contracte acordate unor colective de cercetători. Aceste mecanisme, probabil inerente unei etape de tranziție, au fost deseori grevate de inconstanța unor evaluări ex-ante sistematice a proiectelor propuse, cât și a examinării riguroase ex-post a rezultatelor care să condiționeze continuarea finanțării. Ca urmare a acestor imperfecțiuni, unii cercetători performanți nu au avut acces la finanțarea contractelor, în timp ce unele fonduri au ajuns la persoane de contestată valoare profesională.

Ca un rezultat inerent al unor astfel de situații, credibilitatea sistemului în fața comunității științifice poate fi reinstaurată numai prin introducerea unui mecanism responsabil și imparțial prin care și așa puținele fonduri acordate cercetării să fie alocate prin competiție transparentă sub evaluarea specialiștilor de valoare pe care îi are țara noastră. Fără un astfel de sistem competitiv, tinerii care vor să facă o carieră în știință vor fi confuzionați și dezamăgiți și vor continua să-și caute loc de împlinire pe alte meleaguri. În plus, finanțarea prin competiție a unor indivizi sau colective cu dovedite capabilități performante are avantajele majore de a fi sigur mai eficientă decât finanțarea în bloc și de a reprezenta cea mai concretă cale de evaluare și acreditare a unităților de cercetare.

Ca un lucru îmbucurător, în prezent, fiecare din cele trei mari instituții centrale: Academia Română, Ministerul Învățământului și Ministerul Cercetării și Tehnologiei, își organizează un sistem propriu de finanțare competitivă, virtual deschis și celorlalte rețele de cercetare. Aceste sisteme reflectă unele principii generale comune

nuanțate de o serie de particularități. Prin coexistența și interpenetrabilitatea celor trei sisteme se asigură mult necesarul pluralism al surselor de finanțare. Rămâne de realizat o unificare a criteriilor de evaluare folosite în scopul de a asigura ca pe plan național, fondurile să ajungă la cei mai bine pregătiți și mai performanți cercetători.

Aplicarea practică a acestor sisteme de finanțare competitivă este evident condiționată de înțelegerea și sprijinul concret așteptat din partea Guvernului României și, îndeosebi, a Ministerului de Finanțe. În campania de lămurire a autorităților asupra rolului jucat de fiecare tip de cercetare în progresul economico-social al țării și asupra necesității finanțării diferențiate, prin competiție, este hotărâtor ca cele trei instituții centrale: Academia Română, Ministerul Învățământului și Ministerul Cercetării și Tehnologiei să conlucreze în interesul național. Comunitatea noastră științifică dorește și poate fi un substanțial factor în redresarea economică a țării. Oamenii de știință înțeleg că până la redresarea adecvată a producției economice autohtone, fondurile pe care statul le poate acorda cercetării sunt limitate. Dar chiar și în această situație este datoria autorităților de stat ca împreună cu comunitatea științifică să creeze sisteme manageriale prin care minților creatoare să li se ofere infrastructurile și condițiile materiale necesare pentru a produce știință de valoare. O cercetare științifică perfomantă stă, deopotrivă, la baza a culturii naționale, a progresului economico-social, a asigurării mediului intelectual și tehnologic în care tinerii să se poată împlini, a prestigiului internațional. Treptat trebuie redusă până la anulare distanța care astăzi separa quantumul de fonduri alocate științei de numărul și calitatea cercetătorilor din țara noastă. Introducerea și în România a unor sisteme de finanțare pe bază de competiție are și avantajul obișnuirii cercetătorilor noștri cu standardele și condițiile participării la lupta pentru fonduri din străinătate unde, ca și în alte sectoare ale economiei de piață, competiția a devenit o dimensiune majoră a producției științifice. Sistemul de granturi competitive al Academiei Române este destinat îndeosebi stimulării cercetărilor din domeniile științelor fundamentale și direcționate.

COMENTARII GENERALE ASUPRA FINANȚĂRII COMPETITIVE A CERCETĂRII

1. SISTEMUL GRANTURILOR

Toți cei direct sau indirect implicați în știință sunt de acord că este important să investești în cercetare științifică și în scientiști. Este, de asemenea, recunoscută valoarea deosebită a interdependenței dintre cercetarea fundamentală, cea direcțională și cea aplicativă, a conlucrării comunității științifice cu guvernul, industria și celelalte activități ale societății pe plan național și internațional. Pe un plan deasemeni teoretic, fiecare guvern asimilează relativ facil dezideratul major al pregătirii adecvate a cercetătorilor și al educării în știință a populației, a contribuabililor din impozitarea cărora rezultă o

mare parte din bugetul alocat științei și tehnologiei.
Dar, pentru satisfacerea acestor obiective, banii publici disponibili sunt insuficienți. lar atunci când cei ce pledează pentru prioritatea unui anumit gen de cercetare luptă între ei în loc să conlucreze, efectul final este contraproductiv. Astfel de scenarii deosebit de complexe și complicate lasă și în prezent neidentificată -care este- masa critică a surselor financiare, numărul de scientiști, al facilităților tehnice care ar putea asigura vitalitatea cercetării științifice, tehnologice și de dezvoltare capabilă să îmbogățească calitatea vieții populației dintr-o anumită țară. De aceea, în raport cu gradul său de dezvoltare economico-socială, fiecare țară a adaptat și modulează în continuare sistemele de finanțare a cercetării pe care experiența le-a validat ca cele mai eficiente.

Dintre acestea, cel mai extensiv folosit este cel al granturilor competitive. Acest sistem este puternic dedicat cercetării inițiate de scientiști, oferta de proiect fiind evaluată după meritele științifice, fezabilitate și cost de către comisii de specialiști în domeniu. De-a lungul anilor granturile competitive și-au dovedit eficiența în a promova excelențele, de a aduce oameni noi și idei noi în cercetare, de a stopa impostura și a marginaliza sau elimina non-valoarea; chiar doar din enumerarea acestor avantaje, sepoate deduce cat de mare nevoie are cercetarea romanească de un astfel de sistem. Prin participarea la finanțarea cercetării fundamentale și a pregătirii cercetătorilor a tuturor ministerelor și agențiilor care depind hotărâtor de progresele științei și tehnologiei, in tarile dezvoltate s-a asigurat atât de vitalul necesar pluralism al surselor de finanțare. Acestora li s-a adăugat extinderea (pronunțarea) și diversificarea continuă a cooperărilor internaționale ce promovează fluxul continuu de oameni, idei și date. Legarea tot mai pronunțată a cercetarii academice de progresele tehnologice și de industrie, a convertit știința și dezvoltarea dintr-o aparentă linie de producție într-un veritabil ecosistem al cărui rol este asigurarea și preservarea sănătății, prosperității, securității și calității vieții și a mediului înconjurător pentru toți cetățenii.

La toate acestea, un rol hotărâtor l-au jucat granturile competitive, competiția în sine bazata pe recunoasterea si protejarea valorilor autentice in stiinta. Din analiza modului de alocare a granturilor competitive în diverse țări, reiese că sistemul are un anumit grad de heterogeneitate și că în ansamblul lui nu este lipsit de unele critici. Despre acestea intr-un articol viitor vom putea da mai multe detalii, care de altfel pot fi examinate direct in literatura indicata in bibliografii. Datorita scaderii continue in numeroase agentii guvernamentale din strainatate a procentajului de proiecte finantate (ex. La Institutele Nationale de Sanatate (NIH) din SUA, scaderea a fost de la 62% (1970), la 46% (1975), 35% (1985) si apoi la 18% (1990-1992).

Fundația Națională pentru Știință (NSF) (SUA) experimentează în prezent alocarea de granturi cu buget fix predeterminat (10.000-30.000$). În fața unei extrem de

proliferate birocrației, a unei imense cantități de hârtie consumată (anual la NIH, cca. peste 1000 tone), a timpului investit de mulți cercetători pentru scrierea unei oferte de proiect (cca. 60-70% din timpul de lucru), se încearcă folosirea unui sistem total computerizat atât pentru elaborarea cererii cât și pentru evaluarea ei: Electronic Application Grant, în curs de experimentare la NIH și NSF.

De remarcat că, în timp ce majoritatea țărilor cu știință avansată sunt marcate de limitarea fondurilor bugetare alocabile prin granturi competitive, Japonia raportează o recentă creștere cu cca. 10% a acestor fonduri. Există unele voci, de altfel puține ca număr, care consideră competiția în știință ca ajunsă la un grad dăunător de duritate cu potențiale efecte negative asupra confortului intelectual al unor cercetători. În pofida acestor posibile neajunsuri și în lipsa unei alternative mai bune, sistemul granturilor continuă să domine finanțarea științelor, îndeosebi a celor fundamentale și direcționate ("targeted") fiind convingător, justificat prin progresele substanțiale înregistrate în cercetarea finanțată prin competiție.

2. EVALUAREA PROPUNERILOR DE CĂTRE COMISIILE DE SPECIALIȘTI ("PEER REVIEW")

In majoritatea țărilor, mecanismul de evaluare si selectare a cererilor de grant este definit sub denumirea de "peer review". Deși in conotația sa actuală acest termen are un sens mai cuprinzator (o examinare imparțială, critică dar colegială si nobilă), semnificația inițială a cuvantului "peer" derivă din cuvantul "par" (egal) prin care se subliniază ca evaluatorul trebuie să fie de un rang (calificare) cel putin egală cu cea a solicitantului. Colocvial, termen de substituție utilizați de unii critici ai acestui sistem au mers pana la denumiri că "prietenoasa inchiziție" (friendly inquisition) pe aceeași linie, un "peer" este, în unele țări, numele dat unui expert, membru al unei astfel de comisii de evaluare.

În esență, evaluarea reprezintă elementul de bază al sistemului de granturi competitive. Descrierea amănunțită a întregii proceduri de acordare a granturilor (în particular GAR) va fi redată în articole ulterioare. În cel de față, intenționăm doar să punctăm unele caracteristici de bază ale procesului de evaluare a cererilor de grant, așa cum se efectueaza în țările cu experiență în acest sistem.

Comisiile sunt alcătuite pe domenii, funcționând fie permanent, fie ad-hoc. Membrii comisiilor (5-12) persoane, la nevoie chiar cu participarea unor experți străini), inclusiv coordonatorii lor, sunt numiți dintre specialiști recunoscuți, atât prin valoarea lor științifică deosebită, cât și prin calitățile lor morale dintre care imparțialitatea, probitatea și confidențialitatea sunt absolut necesare procesului de evaluare. În unele țări, numele celor aleși în comisiile de evaluare sunt făcute publice de la inceputul

acțiunii. Aceasta face parte din transparența totală sub care trebuie să se desfășoare mediatizarea, accesul, analiza, evaluarea și finanțarea proiectelor selecționate. Fiecare ofertă de proiect trebuie examinată și evaluată în scris de către cel putin 3 membri ai comisiei, pe baza unor criterii principale, adaptate corespunzator la particularitățile disciplinei respective:

a) meritul științific, originalitatea, importanța potențială a rezultatelor scontate, raportarea lor la cunoștințele deja existente în domeniu;

b) soliditatea gândirii și construirii proiectului și fezabilitatea lui;

c) experiența și performanțele anterioare ale solicitanților capabile să confere șanse suficiente pentru realizarea proiectului propus;

d) condițiile tehnice, de informare, interacțiuni, colaborări, care pot asigura abordarea adecvată a proiectului, factorii de risc, căi alternative;

e) costurile implicate, eligibilitatea cheltuielilor conform cu specificațiile anunțate de consiliu GAR pentru diferitele tipuri de granturi ce le poate finanța (salarii, aparatură, materiale consumabile etc).

Evaluarea se exprimă pe o scara de notație, conventional stabilită în ordine crescătoare de la 1 la 5, 1 la 10 sau invers de la 5 la 1 (ca in SUA).

Odată cu descrierea propriu-zisă a proiectului (făcută pe un formular tip) solicitantului i se cere de asemeni depunerea și a altor materiale care facilitează si substantiază evaluarea (curriculum vitae et studiorum, lista de publicații si extrase ale acestora, acordul institutiei tutelare si al colaboratorilor etc). Practic, pentru fiecare tip de grant se cere un anumit mod de prezentare a cererii, o categorie specială constituind-o programele de interes național, granturile pentru echipamente unicat de inaltă tehnicitate s.a. Asupra acestora vom reveni cu materiale adecvate.

Sistemul de evaluare prin comisii de experți ("peer review") nu a fost scutit de insistente critici, cele mai puternice venind din partea unor specialiști italieni si francezi. Principalele obiecții sunt centrate in jurul urmatoarelor puncte (enumerarea acestora nefiind exhaustivă):

(i) în disciplinele cu o rapidă dezvoltare si reînnoire, cât de adecvat poate fi asigurată componența consiliilor de evaluare? Soluția ar fi lărgirea sau îngustarea componenței acestora?

(ii) componența comisiilor nu trebuie să țină seama decât de calificarea științifică și nu de considerente geografice, minoritățti etnice, sex ș.a.;

(iii) folosirea adecvată a indicilor bibliometrici trebuie extinsă;

(iv) este dificil de protejat ideile noi de cei care le examinează;

(v) o știință potențial creatoare este greu de evaluat deoarece este nouă;

(vi) mecanismul judecării contestațiilor este incă rudimentar pus la punct;

(vii) sistemul actual îi avantajează pe cei care scriu mai bine, ceea ce nu este o calitate obligatorie pentru orice creator de știință.

Acest set de criterii se aplică îndeosebi granturilor individuale sau de grup. Evaluările comisiilor sunt validate de Consiliul organismului acreditat cu coordonarea acordării granturilor in cauză, iar rezultatele finale sunt comunicate in scris solicitanților și făcute publice. Finanțarea poate fi făcută pentru perioade de 3-5 ani, dar reînnoirea ei anuală este riguros conditionată de primirea din partea beneficiarului de grant a unui raport detaliat asupra rezultatelor parțiale obținute și folosirii adecvate a fondurilor primite.

Există un consens general conform căruia actualul sistem de evaluare, cu diversele lui variante, necesită o continuă reevaluare de către însiși cei ce sunt implicați în aplicarea lui, sau beneficiază de acest mod de finanțare. Recent au fost formulate diferite propuneri, dintre care unele par a fi asimilate deja in sistem. Câteva exemple:

i) să se pună un mai mare preț pe performanțele anterioare ale solicitantului ("evaluare retrospectivă");

ii) acordarea unui numar mai mare de "granturi modulare" cu buget relativ moderat, prefixat, lăsat la libera folosință a beneficiarului; aceasta ar crește numărul tinerilor cercetatori finanțați prin granturi competitive;

iii) participarea celor mai calificați oameni de știintă in comisiile de evaluare trebuie considerată o datorie civică majoră cu atât mai mult atunci când aceștia au fost sau sunt beneficiarii unor astfel de granturi;

iv) apare promițător sistemul de înregistrare si evaluare computerizata a cereriloe de grant, dar elaborarea lui in detaliu și dovedirea eficientei si acurateței unei astfel de tehnologii necesită înca susținute experimentari.

Combinând unele dintre sugestiile de mai sus, o interesantă recomandare propune ca alternativă la actualul sistem convențional de "peer review" un mecanism de evaluare "bicamerală". Conform cu acesta o cerere de grant ar trebui sa conțină doua părți distincte: una "retrospectivă" și alta "prospectivă". Partea retrospectivă care descrie ce s-a realizat până atunci (rezultate publicate sau nepublicate) va fi trimisă separat la comisia de evaluare, care va estima valoarea performanțelor în raport cu fondurile primite. Partea prospectivă va fi înaintată unui grup de specialiști în finanțe și scientică aparținând agenției care finanțează. Aceștia vor decide asupra bugetului ce se justifică și, în cooperare cu evaluatorii primei părți, pot face recomandări de căi mai economice de a realiza proiectul. Evident, nici acest sistem "bicameral" nu este în afara criticilor.

Ținând seama de avantajele și limitele sistemului de granturi competitive, de faptul că este utilizat de peste patru decenii și adoptat de care marea majoritate a țărilor care, cel puțin în parte, finanțează de la buget cercetarea fundamentală, Academia Română și-a conturat propriul sistem de finanțare după experiențele cele mai puțin criticabile obținute de diferite organisme de finanțare din țările cu știință avansată.

ACTIVITĂȚILE PROFESORULUI NICOLAE SIMIONESCU
ÎN ANUL ÎN CARE A FOST VICEPREȘEDINTE AL ACADEMIEI ROMÂNE
(FEBRUARIE 1994 - FEBRUARIE 1995)

ACTIVITĂȚILE PROFESORULUI NICOLAE SIMIONESCU ÎN ANUL ÎN CARE A FOST VICEPREȘEDINTE AL ACADEMIEI ROMÂNE (FEBRUARIE 1994 - FEBRUARIE 1995)

A. ACȚIUNI ORGANIZATORICE PRIVIND CERCETAREA ȘTIINȚIFICĂ ÎN ACADEMIA ROMÂNĂ

(1) Inițierea "Planului de Acțiuni pentru Îmbunătățirea Cercetării Științifice în Academia Română", aprobat de Adunarea Generală 11 mai 1994 (publicat în Academica IV/8 (44), 1994, p.15-18). Formarea și interacția cu 14 grupe de lucru pentru elaborarea propunerilor de măsuri.

(2) Inițierea "Sistemului de Finanțare Competitivă a Cercetării Științifice prin Granturile Academiei Române (GAR)" și alcătuirea împreună cu alți colegi a Consiliului GAR și a Regulamentului de acordare a Granturilor, aprobate de Prezidiu și Adunarea Generală la 8 noiembrie 1994 și publicate în Academica, 2 (50), decembrie 1994, p. 15-18.

B. ACȚIUNI ORGANIZATORICE PRIVIND CERCETAREA ȘTIINȚIFICĂ PE PLAN NAȚIONAL

(1) Elaborarea, în colaborare cu ceilalți membri ai grupului de lucru în Proiectul Băncii Mondiale a studiului "Direcții ale Reformei în Activitatea de Cercetare Științifică și Dezvoltare Tehnologică din România". Particularizarea unor propuneri privind rețeaua instituțională a Academiei Române.

(2) Introducerea prin intermediul Comitetului Național de Biotehnologie Avansată a unui sistem de granturi competitive pentru (a) proiecte de cercetare și (b) laboratoare metodologice de biotehnologie moleculară (ADN recombinat, anticorpi monoclonali, culturi de celule). Propunerile selecționate de comisii de specialiști, au fost parțial finanțate de Ministerul Cercetării și Tehnologiei (18 proiecte și 14 laboratoare metodologice).

(3) Ca președinte al Comisiei de Biotehnologie a Colegiului Consultativ pentru Cercetări Aplicative și de Dezvoltare, a organizat evaluarea ex-ante a propunerilor de proiecte de biotehnologie printr-un sistem de "peer review". Au participat 36 de specialiști ce au evaluat 75 cereri de finanțare. Recomandările comisiei au fost transmise conducerii MCT.

(4) Analiza și formularea de observații privind proiectul Legii Cercetării și Legii

Învățământului. Discutarea acestor observații în cadrul Comisiilor de specialitate ale Camerei Deputaților, Senatului, Consiliului de Coordonare, Strategie și Reformă Economică al Guvernului României.

(5) Elaborarea, împreună cu împuterniciții Ministerului Cercetării și Tehnologiei și ai Ministerului Învățământului, a unor propuneri privind "Strategia cercetării științifice și dezvoltării tehnologice în România", material solicitat de Consiliul pentru Reformă Economică al Guvernului și de Președinția României.

C. ALTE ACȚIUNI PROFESIONAL-ȘTIINȚIFICE PE PLAN NAȚIONAL

(1) Organizarea, împreună cu Dr. G. Levi (Ecole Normale Superieure - Paris) a unui Curs Internațional de Tehnologie in Biologie Moleculară, Sibiu, iunie 1994. 28 de cursanți români, prelegeri și demonstrații practice ținute de specialiști din Franța, Italia și România.

(2) Organizarea împreună cu Prof. A. Combiescu, Dr. C. Știrbu și Dr. D. Balazs a Colocviului Româno - Francez pentru comemorarea Anului Pasteur - 1995, ce a avut loc la București între 4 și 6 octombrie 1995 (vezi Academica, 2 (50), decembrie 1994, p. 32), sub egida Academiei Române, Institutului Cantacuzino și Institutului Pasteur.

(3) Participarea, în calitate de Vicepreședinte, la lucrările Comisiei Superioare de Atestare și la întâlnirile biroului acesteia cu comisiile de specialitate ale Camerei Deputaților și Senatului.

(4) Alocuțiunea privind "Contribuția Academiei Române la protejarea integrității mediului", cu ocazia adunării festive consacrată "Zilei Mondiale a Mediului", București, 1994.

D. PARTICIPAREA LA ACȚIUNI PROFESIONAL - ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE

(1) Participarea, în calitate de Coordonator național al Programelor de Cooperare cu Comitetul Științific NATO, la reuniunea acestui organism, ținută la Bruxelles (17-18 martie 1994), unde a prezentat raportul "Current Activities that could be subject to Cooperation under NATO Science Programme" referit în darea de seamă a reuniunii (publicat în Academica, p.32, apr. 1994)

(2) Participarea la elaborarea unor propuneri privind realizarea, în cadrul Programelor Prioritare NATO, unor "Advanced Study Institutes" și "Advanced Research Workshops", pentru anii 1995-1996 împreună cu cercetători americani (prof. N. Kefalides, Philadelphia, USA) și greci (Porto Caras, Grecia), iulie 1994.

(3) Participarea ca invitat de onoare la deschiderea oficială a Bibliotecii Universale, din Szentes, Ungaria, 18-20 aprilie 1994. În cadrul Simpozionului Inaugural Acad. Nicolae Simionescu a prezentat conferința "The cells, a wisdom in identity and integration". Participarea împreună cu Acad. Maya Simionescu la întrunirea "Comitetului Director și de Planificare" al "Universității Internaționale a Europei Centrale" (vezi raportul publicat în Academica, mai 1994, p. 32).

(4) Urmare a invitației Institutului Pasteur din Paris, în perioada 23 octombrie-2 noiembrie, în calitate de președinte al Comitetului de Organizare Acad. Nicolae Simionescu.împreună cu Acad. Maya Simionescu și Prof. Combiescu au inițiat discuții cu privire la stabilirea programului preliminar al Comemorării Anului Pasteur, în perioada 4-6 octombrie 1995, la București, sub egida Academiei Române.

(5) Participarea în calitatea sa de membru în Comitetul de Selecție pentru acordarea Premiului "The Ettore Majorana Prize Erice: Science for Peace", Erice, Italia, 1994.

(6) Elaborarea raportului ce urma a fi prezentat la Sesiunea Comitetului Științific NATO de la Budapesta la 23-24 martie 1995. Din nefericire, "timpul nu a mai avut răbdare", iar acest din urmă punct nu a mai putut fi bifat în agenda de lucru a Prof. Nicolae Simionescu, căci, asemenea multor altor gânduri nerostite, planuri abia schițate sau idei îndrăznețe, în dimineața zilei de 6 Februarie 1994, Profesorul le-a luat cu sine, trecându-le în eternitate.

REVISTE INTERNAȚIONALE: DESPRE PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU

ARTICOL APĂRUT ÎN REVISTA „NATURE", VOL. 344, 1990

Aside from his mailing address, there is little to distinguish Nicolae Simionescu from other cell biologists. He publishes in international journals, edits chapters of books, attends conferences and spends as much time as he can in the laboratory.

What is unique about Simionescu is that he does all this under surreal conditions in his native Bucharest, where he is director of the Institute for Cellular Biology and Pathology (ICBP). The institute specializes in the cell biology of the cardiovascular system.

ICBP appears to be the only institute in Romania that has been able to keep up with Western labs. This is no slight to other researchers in Romania, who can be justifiably proud of what they have achieved, sometimes using considerable ingenuity to make up for a lack of resources. But in most cases, working with equipment 20 years old or more and in isolation from the rest of the world has taken a severe toll.

Simionescu, 64 years old and a physician by training, is the first to admit that setting up the institute would not have been possible had he not first left Romania to work in the United States for ten years.

Simionescu began to negotiate with the Romanian government in 1972 about opening an institute. He and his wife, Maya, were professors at the Rockefeller University in New York and did not have to go back to Romania. "My American friends called me a superstitious patriot" for pursuing the "crazy idea" of an institute in Bucharest, he says. "But I persevered." The Simionescus designed ICBP themselves – "every mistake you see is ours," they say. They returned annually to Bucharest to supervise construction until ICBP was finally completed in 1979.

Negotiating from strength, Simionescu insisted that he and Maya be allowed to keep their faculty positions at Yale, where they had moved in 1973. And they insisted that they be allowed to "hand-pick" the institute staff of 140 and have their top people trained in the United States.

Maintaining Western contacts turned out to be essential when, in 1980, government support in the form of hard currency "dried up" and the Simionescus were on their own in purchasing books, journals and laboratory supplies. Since then, a renewable grant from the US National Institutes of Health (NIH) has kept ICBP alive. The grant is the only one NIH gives to Eastern Europe and one of only 7 (out of 5,000) given to non-US groups.

"Our library became utterly dependent on donations from people we knew in the States", recalls Maya Simionescu. Nevertheless, the library became a "magnet" to other researchers in Bucharest who could not read the literature anywhere else.

Life in Bucharest has not been easy. In addition to living with "paranoid" restrictions like only using a single light bulb in a room, Simionescu has had occasional confrontations with the Communist authorities. "Once, a man from the government

came and asked us if we knew about membranes," says Simionescu. "He wanted us to produce some kind of filters for industry. We had to explain that our area is cell membranes."

The Simionescus have had answer to the authorities in both Romania and the United States because of their frequent travel. "Both the Securitate [Romanian secret police] and the FBI thought we were sellings secrets,' says Simionescu.

But aside from these conflicts – and the occasional accusation of "growing up a special breed of apolitical investigators," the government" did not dare to bother us much," says Simionescu.

"Of course, we provided them every year with a propaganda coup – we kept returning from the States" to Communist Romania, he says, The revolution came none too soon for Simionescu, who says that the political situation had deteriorated dramatically in the last five years.

Since then, nothing and everything has changed. Simionescu does not anticipate receiving any new money from the government beyond what ICBP already gets, which poses problems for replacing equipment long overdue for overhaul. Nevertheless, he is "very optimistic" about the future of the institute and Romanian science in general. Says Simionescu, "At least now we can turn the lights on."

"BOOTSTRAPPING A NEW INSTITUTE" ARTICOL APĂRUT ÎN REVISTA „NATURE", VOL. 372, 1994

Bucharest. The jewel in the crown of the Romanian Academy of Sciences is the Institute of Cellular Biology and Pathology, run by the husband-and-wife team Nicolae and Maya simionescu.

A thriving centre, with 130 staff, 50 of them scientists who have mostly worked abroad, the institut is one of the very few in Romania performing world-class research. It concentrates its efforts on the molecular and cell biology of the cardiovascular system, with particular reference to atherosclerosis.

The centre did not attain this position easily. Its present status is entirely the product of the determination of its director to provide a haven for good science in his home country despite the almost impossible political situation.

Nicolae Simionescu made his escape from Romania in 1970 when, after a year-long struggle, he got a visa to visit the United States. He spent the next three years as a research fellow at the Rockeffeller University and then moved to Yale, where he eventually became a professor.

Despite his success across the Atlantic, Simionescu always wanted to return home to help make it possible to do good research work in Romania. In 1972, he sent the government a proposal for the building of an institute of cell biology, in which there were virtually no studies anywhere in Romania. His association with George Palade, a Noble prizewinner and Romanian expatriate, helped his cause; the

following year, the government approved the proposal in principle.

Simionescu agreed to return to run the institute under certain very strict conditions, the most important being that he would be allowed to spend a part of each year in the United States, and that he would be able to send his young scientific staff there for training.

After numerous delays, during which decisions were repeatedly made and unmade, the institute, reasonably equipped, finally came into being in 1979.

The Simionescus came home. But they were immediately told by the Ministry for Health and Education that funds had run out. The institute would receive funds only for salaries and maintenance costs.

For the succeding decade, the Simionescus survived on substantial grants from the United States – for a time, they were the only institute in eastern Europe to hold grants from the US National Institutes of health – and brought vast shipments of equipments and journals back with them from their annual visits to the United States. Customs records show that, between 1979 and 1992, they transported 14,000 kg of material, worth US$33,000.

In addition, Simionescu managed to send 16 young scientists to work in laboratories in the United States during the 1980s. Surprisingly, none defected: all returned to form the core staff of the institute.

The Simionescus established a number of traditions in their institute during the 1980s, in defiance of the government. One was to require all scientists to give regular progress reports of their projects in English, to ensure that language did not become a scientific barrier. They also held regular US-Romanian scientific workshops, bringing in US scientists, using US money.

The Simionescus have sought to nurture a broader appreciation of culture. They play taped classical music concerts in the common-room with information sheets about the composer taped to the tables, and have used their auditorium to hold cultural, as well as scientific, events. They celebrate Christmas – complete with Christmas tree and Santa Claus – for the staff and their children and insist that everyone takes the day off.

These actions regarded by the old regime as provocative, but they were tolerated. But as time went on, the institute began to be regarded with more and more suspicion by Ceausescu, culminating in his declaration in September 1989, at the height of his paranoia, that Simionescu was a US spy, selling Romania's scientific secrets. His visa, needed to allow him to complete his autumn lectures at Yale, where he was still a visiting professor, was withdrawn. After pressure from US scientists and the US embassy, he was belated allowed to.go. "It was a very scary time", he remembers thinking it would be his last trip. But when he returned in January 1989, the revolution had changed everything.

There can be no comparison between conditions now and then, says Simionescu, even though present is very far from ideal. Funds are now decreasing, not increasing. And although there is now complete freedom to travel, as often as not

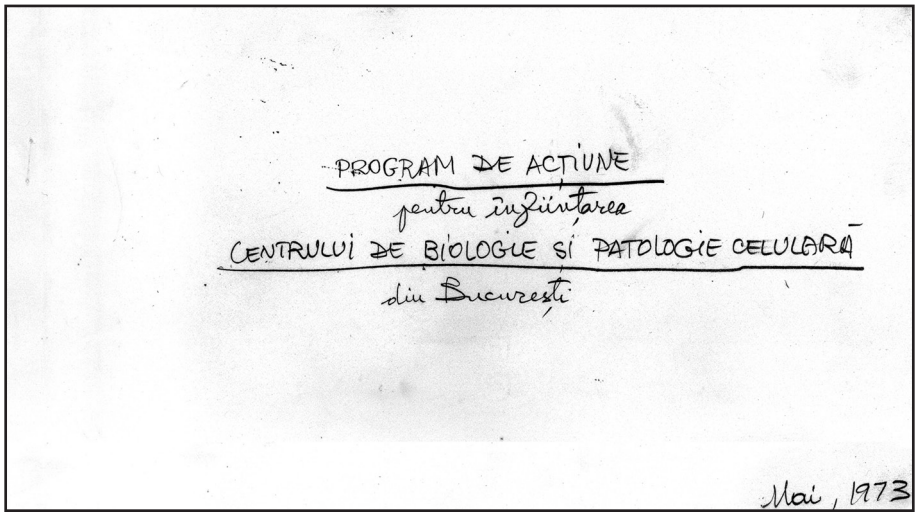
the young scientists who continue to be sent abroad for training no longer return. Indeed, some of those who resisted the temptation to defect during their periods abroad in the 1980s now want to leave. "They do not complain that they cannot do good researche here", says Simionescu; "It is mostly because the salaries are too low."

The Simionescus remain undaunted. Their strategy is to keep training new people, even is the returns are now likely to be lower.

Nicolae Simionescu is also devoting energy to encouraging reforms within the academy as a whole. He is also in charge of Romania's biotechnology programme and has arranged for a small amount of its funds to be set aside for competitive grants. This is, for the time being, the only example of competitive project money in Romania.

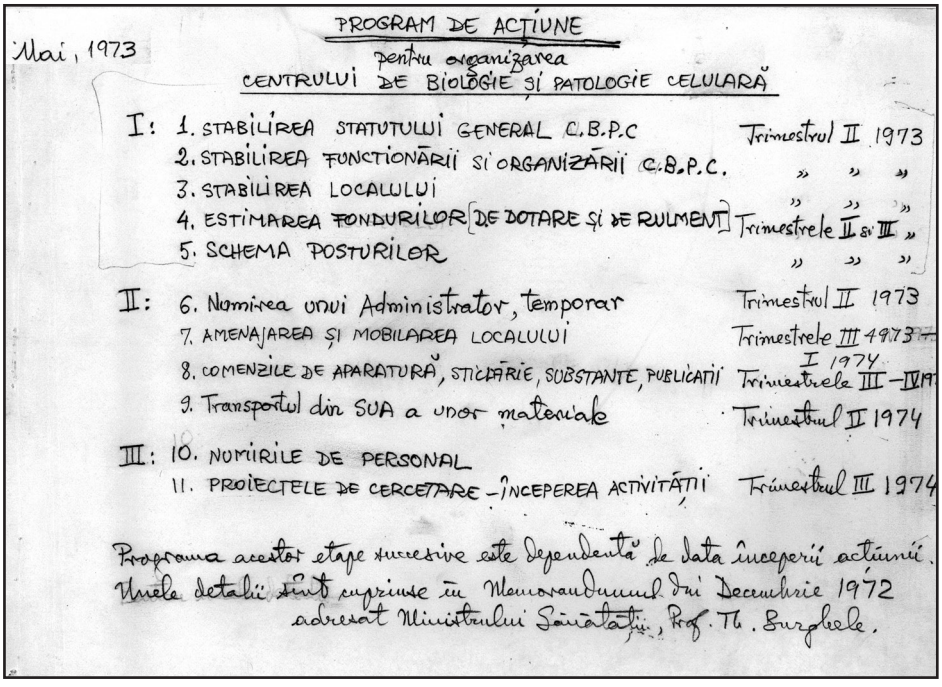
ETAPE ÎN REALIZAREA VISULUI

CONCEPȚIA



PROGRAM DE ACȚIUNE
pentru înființarea
CENTRULUI DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ
din București

Mai, 1973



Mai, 1973

PROGRAM DE ACȚIUNE
pentru organizarea
CENTRULUI DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ

I:	1. STABILIREA STATUTULUI GENERAL C.B.P.C	Trimestrul II 1973
	2. STABILIREA FUNCȚIONĂRII ȘI ORGANIZĂRII C.B.P.C.	" " "
	3. STABILIREA LOCALULUI	" " "
	4. ESTIMAREA FONDURILOR [DE DOTARE ȘI DE RULMENT]	Trimestrele II și III "
	5. SCHEMA POSTURILOR	" " "
II:	6. Numirea unui Administrator, temporar	Trimestrul II 1973
	7. AMENAJAREA ȘI MOBILAREA LOCALULUI	Trimestrele III 1973 — I 1974
	8. COMENZILE DE APARATURĂ, STICLĂRIE, SUBSTANȚE, PUBLICAȚII	Trimestrele III — IV 19
	9. Transportul din SUA a unor materiale	Trimestrul II 1974
III:	10. NUMIRILE DE PERSONAL	
	11. PROIECTELE DE CERCETARE - ÎNCEPEREA ACTIVITĂȚII	Trimestrul III 1974

Programa acestor etape succesive este dependentă de data începerii acțiunii. Unele detalii sînt expuse în Memorandumul din Decembrie 1972 adresat Ministerului Sănătății, Prof. Th. Burghele.

I. 1. STABILIREA STATUTULUI GENERAL AL CENTRULUI DE BIOLOGIE SI PATOLOGIE CELULARĂ

– 1973 –

Scopul: cercetări asupra funcționării, îmbolnăvirii și recuperării celulelor, în special a celor umane,

Denumirea: Centrul de Biologie și Patologie Celulară (CP) [CBPC]

Apartenență: unitate autonomă, aparținând rețelei de cercetare a Ministerului Învățământului sau a Ministerului Sănătății

Subordonare: dublă: Ministerul Sănătății [în special pentru activitatea de cercetare] și Ministerul Învățământului [pentru activitatea didactică, recrutarea și pregătirea de doctoranzi și specialiști].

Obiective: a. Cercetare de biologie și patologie celulară, în special umană
b. Învățământ de specialitate
c. Formare de specialiști
d. Dezvoltarea diverselor activități științifice din domeniul biologiei celulare

Unitatea va fi patronată și susținută în activitatea ei de către Prof. G.E. Palade [Rockefeller University, New York], din toamna 1973, la Univ Yale – New Haven, USA

I: 3. STABILIREA LOCALULUI

Conform specificului funcțional și dotării laboratoarelor de specialitate și serviciilor anexe [pct. I 2]:
– construcție nouă sau
– construcție existentă adecvată, care va fi reamenajată corespunzător

[Anexa 1 [Solicitare de fond] a Memorandum-ului din Dec. 1972]

I: 4. ESTIMAREA FONDURILOR ALOCATE DOTĂRII și A FONDULUI DE RULMENT

FONDURILE INITIALE ALOCATE

a. Pentru amenajarea și mobilarea clădirii

b. Pentru dotarea cu echipament: – valută Vest
– valută Est
– producție indigenă

c. Pentru procurarea de consumabile [chimicale, veselă, fotografice, publicații etc]: – valută Vest
– valută Est
– producție indigenă

FONDURILE DE RULMENT

a. Pentru servicii întreținere, piese schimb

b. Pentru cumpărarea de consumabile
– valută Vest
– valută Est
– producție indigenă

c. Fondul de salarii

I: 5. SCHEMA DE POSTURI

Personal de cercetare ± învățământ: [medici, biochimiști, biologi, inginer etc]

– 10–12 poziții permanente [conform organizării și dominării sub imitatilor de lucru]

– 8–10 " nepermanente [asociați în cercetare pe 1-2 ani]

Personal technic ajutator

– inginer electronist
– tehnicieni electroniști : 2
– " microscopiști = 4
– " biochimiști = 4
– " radioizotopiști : 1
– " fotografi = 2
– " mecanică fină = 1
– laboranți = 8
– bibliotecar-documentarist = 1
– secretară-dactilografă = 1
– sticlar = 1

Personalul de îngrijire: corespunzător spațiului de întreținut

Personalul Vivarium-ului: medic veterinar, 2 tehnicieni veterinari, 2 laboranți, 4 îngrijitori de animale.

II: 6. Numirea unui Administrator, temporar

pentru supravegherea: — amenajării localului
— mobilarea și dotarea laboratoarelor
— importul de aparate și substanțe etc

7. AMENAJAREA ȘI MOBILAREA LOCALULUI — vezi și pct I3 —

Conform Schiței de plan [Anexa 1 la Memorandum-ul din Dec 1972] ce va fi amănunțită și completată cu indicațiile privind construcțiile speciale:

— Camerele frigorifice și instalația termostat
— Nisele exhaustoare și nisele cu flux laminar
— Amplasarea aparaturii, surselor de apă, electricitate, vacuum etc
— Instalațiile centrale pentru apă distilată, vacuum, frigorime
— Mobilierul de laborator, consolele
— Laboratorul fotografic și camerele obscure
— Vivariumul

II: 8. LISTELE ȘI COMENZILE DE APARATE, SUBSTANȚE, PUBLICAȚII etc

LISTELE: [fr. II-III 1973]

a. Echipamentul de specialitate, import Vest: lista prezentată ca Anexa 2 la Memorandum-ul din Dec-1972
b. Aparate, import Est
c. Aparate, producție indigenă
d. Sticlărie import
e. " producție indigenă
f. Chimicale și fotografice, alte consumabile, import
g. " " " , producție indigenă
h. Cărți și abonamente la reviste de specialitate
i. Mobilier

Ulterior se va face planificarea de consumabile anual pt 1975-76

COMENZILE: pot fi efectuate în trimestrul III 1973

LIVRĂRILE: pentru trimestrele II și III 1974

9 TRANSPORTUL DIN SUA AL UNOR MATERIALE

III: 10. NUMIRILE DE PERSONAL

. Conform necesarului indicat la punctul I5.
. Începînd cu următorul an școlar vor fi recrutați și un număr de doctoranzi interesați în a lucra în domeniu și a-și face lucrarea de diplomă în cadrul CIBPC.

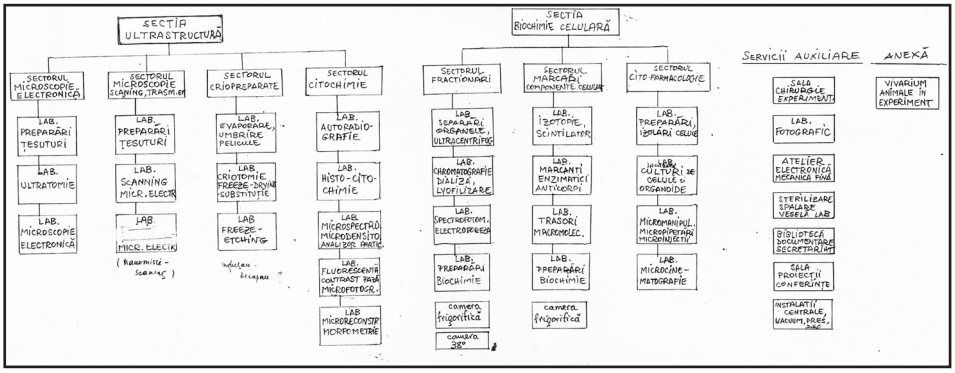
III: 11. STABILIREA ~~PROIECTELOR~~ DE CERCETARE ȘI ÎNCEPEREA ACTIVITĂȚII

a. Cercetarea : conform proiectelor de cercetare și a acordului de colaborare cu unitatea Prof C Palade (SUA). = trimestrul III 1974

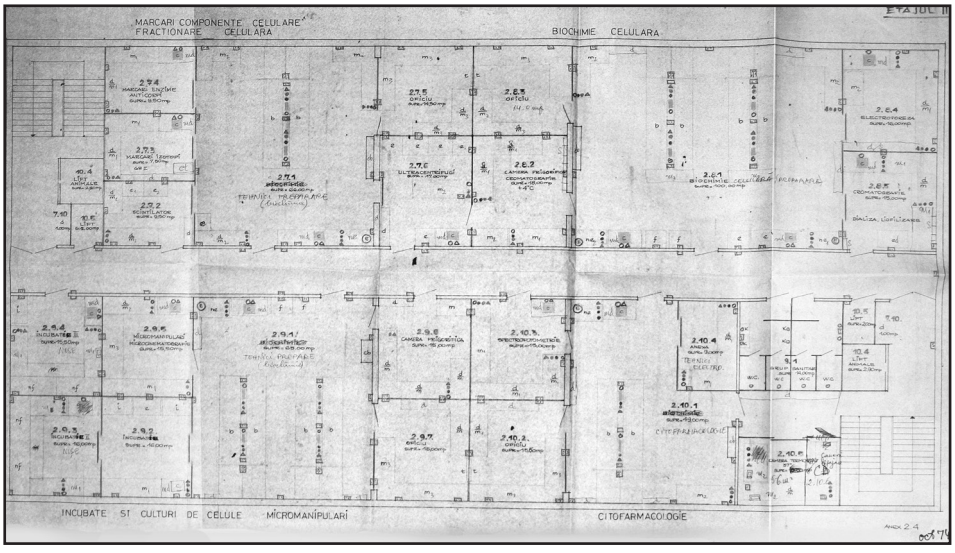
b. Învățământul : cursul de Biologie și Patologie Celulară poate începe ~~în~~ în cursul anului școlar 1974-75

Ss. N. Simionescu

Octombrie 1974



Octombrie 1974



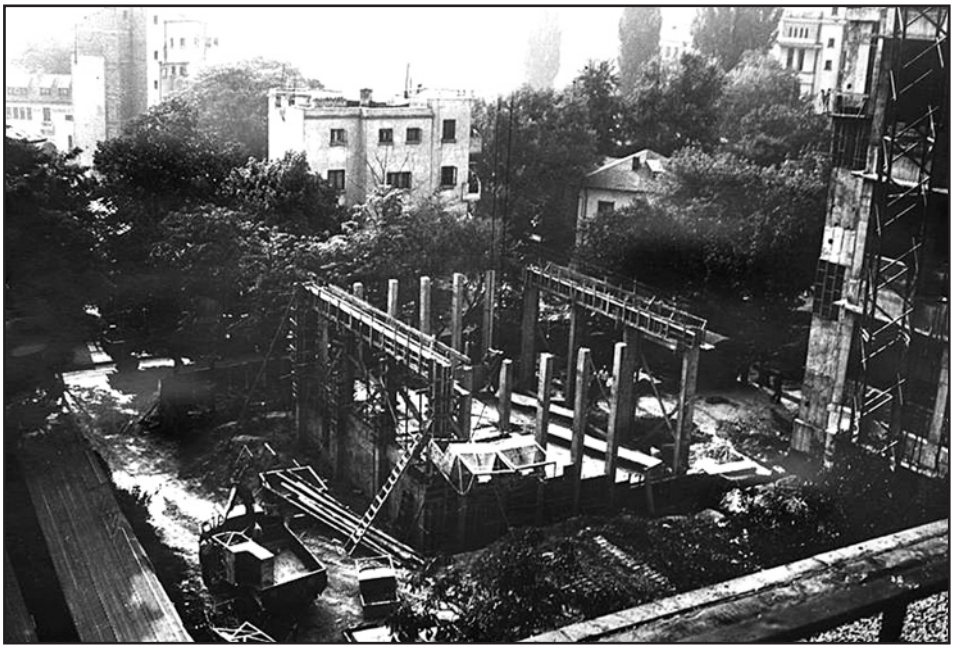
CONSTRUCȚIA

COLECTIV DE PROIECTARE:
ARHITECTURĂ: arhitecții **IOAN ANTONESCU** (șef proiect), **ȘERBAN PROVIAN, ANCA MUNTEANU, ION ȘTEFĂNESCU, CORINA ASLAN,** proiectant **JOSEFINA GEORGESCU**
REZISTENȚĂ: ing. **EUGEN ȚIGĂNESCU**
INSTALAȚII: inginerii **VALENTIN DRĂGĂNESCU, ANCA MARINESCU** (electrice), **VENERA GHEORGHIU, MIHAI VOICULESCU** (sanitare și fluide speciale), **CONSTANTIN BUZDUGAN** (ventilație, climatizare), **MARCELA COLIU** (termice)
DRUMURI ȘI SISTEMATIZARE VERTICALĂ: ing. **CORNELIU ANGELESCU**
MOBILIER: arh. **AGRIPA POPESCU**
PROIECTANT GENERAL: CENTRUL DE PROIECTARE PENTRU CONSTRUCȚII DE ÎNVĂȚĂMÂNT ȘI DE CERCETARE AL MINISTERULUI EDUCAȚIEI ȘI ÎNVĂȚĂMÂNTULUI
CONSTRUCTOR: CENTRALA DE CONSTRUCȚII MONTAJ A MUNICIPIULUI BUCUREȘTI
CONSULTANT DE SPECIALITATE: PROF. DR. NICOLAE SIMIONESCU

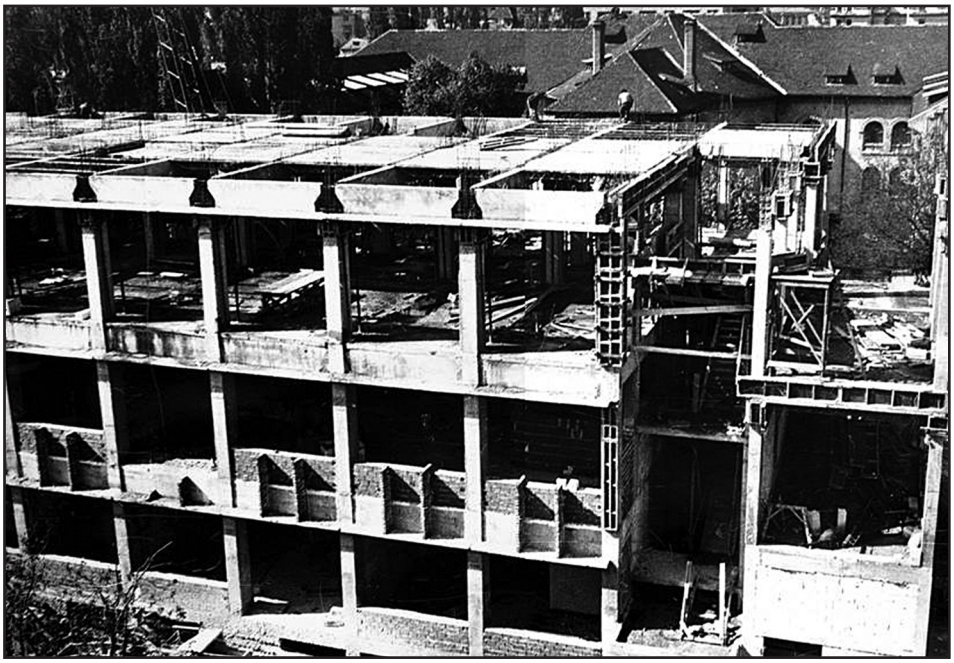
Alegerea locului (1973)

Se pun temeliile (1974)

Şantier (1977)

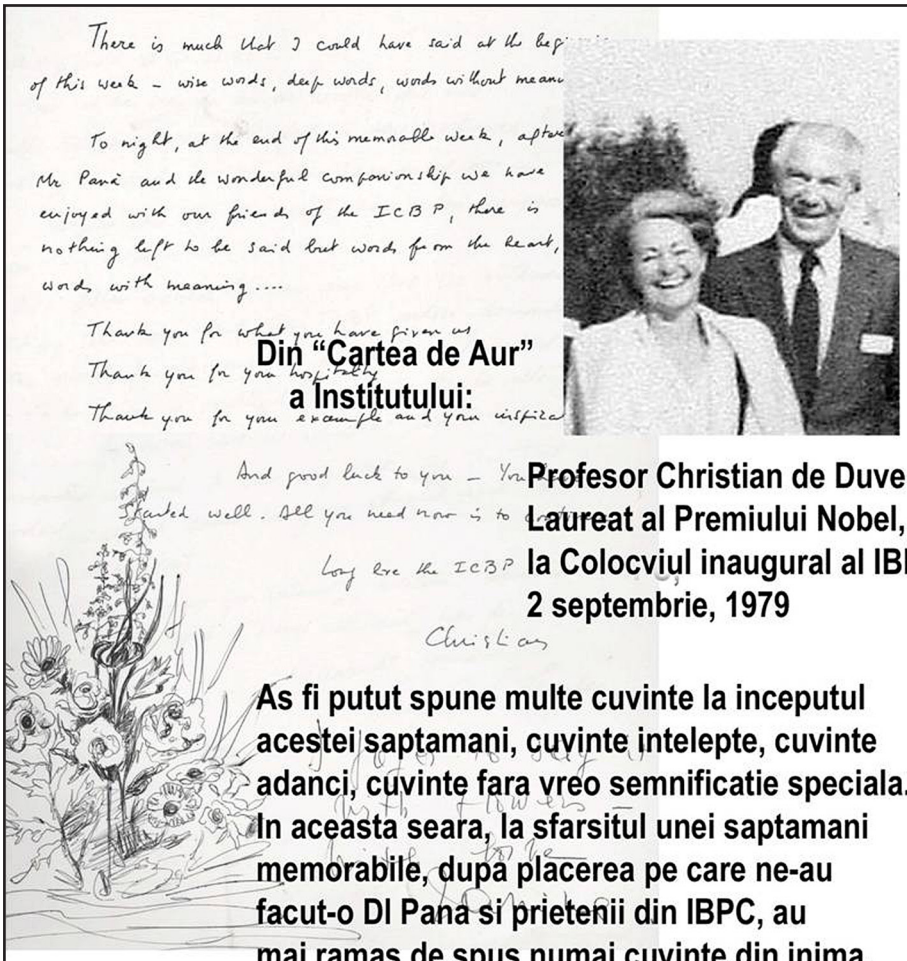


Ridicarea clădirii (1977)



Institutul - Casa noastră științifică
(1979}

AMINTIRI



There is much that I could have said at the beg
of this week - wise words, deep words, words without meanu

To night, at the end of this memorable week, after
Mr Pana and the wonderful companionship we have
enjoyed with our friends of the ICBP, there is
nothing left to be said but words from the heart,
words with meaning....

Thank you for what you have given us
Thank you for your hospitality
Thank you for your example and your inspira

And good luck to you - You
started well. All you need now is to

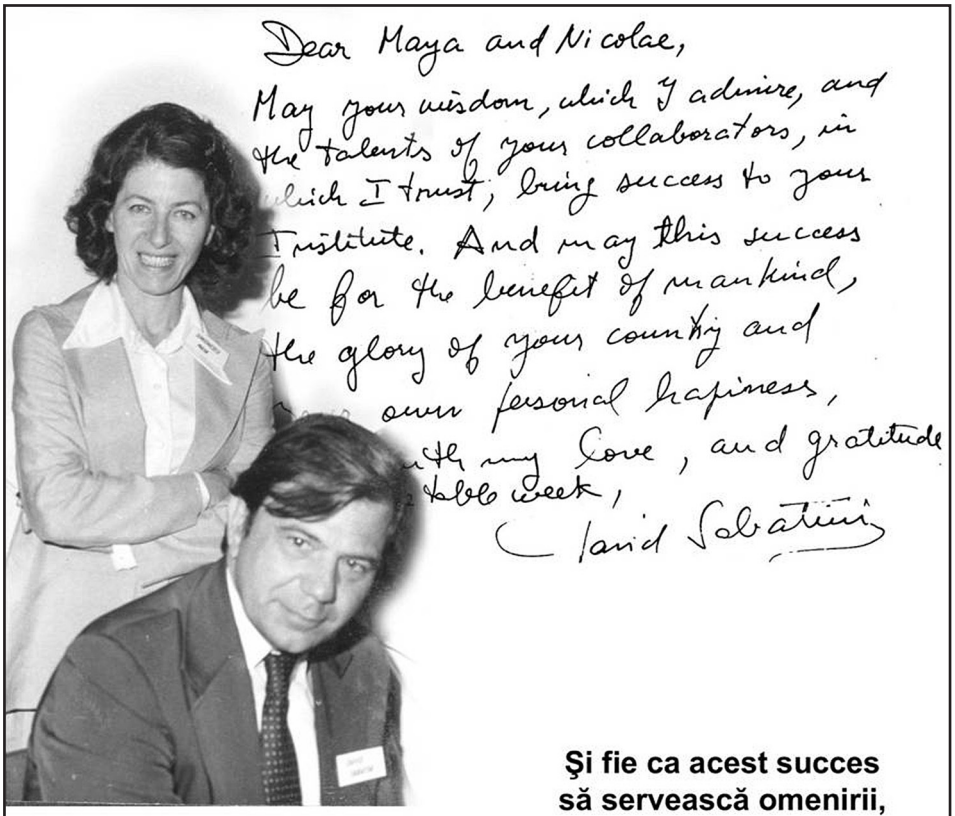
Long live the ICBP

Christian

Din "Cartea de Aur" a Institutului:

Profesor Christian de Duve, Laureat al Premiului Nobel, la Colocviul inaugural al IBPC, 2 septembrie, 1979

As fi putut spune multe cuvinte la inceputul acestei saptamani, cuvinte intelepte, cuvinte adanci, cuvinte fara vreo semnificatie speciala... In aceasta seara, la sfarsitul unei saptamani memorabile, dupa placerea pe care ne-au facut-o Dl Pana si prietenii din IBPC, au mai ramas de spus numai cuvinte din inima, cuvinte cu o semnificatie speciala.....
Va multumesc pentru ce ne-ati oferit.
Va multumesc pentru ospitalitate.
Va multumesc pentru exemplu si inspiratie.
Va doresc succes. Ati inceput bine.
Trebuie sa continuati. Sa traiasca IBPC.



Dragă Maya şi Nicolae,

Fie ca înţelepciunea voastră - pe care eu o admir – şi talentul colaboratorilor voştri – în care eu cred – să aducă mult succes institutului vostru.

Şi fie ca acest succes să servească omenirii, gloriei patriei voastre şi propriei voastre fericiri. Cu toată dragostea şi recunoştinţa pentru această săptămână de neuitat.

David Sabatini

EMOȚIA ȘTIINȚEI

Unul dintre dumneavoastră m-a întrebat ieri: „Cum se poate câștigă un Premiu Nobel?" Am știut că este o glumă. Aș vrea însă să dau un răspuns serios la întrebarea aceasta: „Nu lucrați cu scopul Premiului Nobel".

În viață se întâmplă ca un cercetător/o cercetătoare să dobândească o apreciere, ca un premiu, o invitație de a susține o conferință la un congres important, să fie ales/aleasă ca membru al unei academii, să obțină un grad onorific sau alte semne de apreciere. Problema este, însă, că astfel de aprecieri au loc foarte rar și de obicei foarte târziu în viață. Un om care intră în domeniul științei cu scopul de a obține o apreciere este absolut nebun. Recompensele și aprecierile din știință sunt cu totul altele.

Emoția științei este atunci când nu poți dormi noaptea gândindu-te la problema care te frământă, întorcând-o pe toate fețele în mintea ta, luptându-te cu ea până când îți vine în minte o idee, o explicație posibilă, o nouă cale experimentală care ar putea conduce la o soluție.

Emoția științei este atunci când nu ai răbdare să ajungi dimineața la laborator și să-ți experimentezi ideea făcând experimentul la care te-ai gândit.

Emoția științei este rezultatul experimentului, plăcerea aproape senzuală a atingerii pipetelor, eprubetelor, a instrumentelor de măsură și a microscoapelor, bucuria fizică a folosirii mâinilor tale cu iscusință și cu acuratețe.

Emoția științei este atunci când începi să vezi primele rezultate… și îți dai seama, cum se întâmplă adesea, că a fost ceva greșit în experiment și el trebuie refăcut sau că este ceva greșit în ideea ta și trebuie să o regândești.

Emoția științei este atunci când ai adunat destule rezultate și începi să le scrii pentru publicare, aruncând la coș versiune după versiune, până când, în final, ajungi la ceva care crezi că merită a fi publicat…, pentru că după câteva săptămâni să primești înapoi manuscrisul văzut de referenți cu observațiile acestora mai mult sau mai puțin amabile.

Emotia științei este de a-ți vedea lucrarea aparută, de a primi primele cereri de extrase și de a realiza că undeva, la celălalt capăt al pământului se află cineva chiar interesat în ceea ce ai făcut.

Emoția științei este aceea de a te simți parte a unei echipe, de a interacționa cu prietenii și colegii tăi indiferent dacă în discuții aprinse sau în împărtășirea satisfacțiilor, și, la o scară mai largă, de a te simți parte a unei rețele mondiale, a comunității internaționale cu aceleași scopuri, interese și standarde.

Acestea sunt recompensele zilnice, de ne înlocuit și cu o valoare imensă. Dacă totuși – oameni suntem – doriți și o asigurare dinafară, pe lângă satisfacțiile personale, atunci sfatul meu este: încearcă să câștigi respectul celor pe care tu însuți îi respecți.

Profesor Christian de Duve
Laureat al Premiului Nobel
Cuvânt la masa de adio IBPC, București, 7 septembrie 1979

A POEM FOR MAYA AND NICOLAE ON THE OCCASION OF THE WORKSHOP ON THE BIOLOGY OF THE VESSEL WALL BANQUET – 25TH AUGUST, 1983

BY MORRIS J. KARNOVSKY

Many miles we did fly
To visit Maya and Nicolai,
We came from places far away
As Australia & the USA.
And at this unique Institute
With admiration were struck mute.
If Harward my labs ever renovate in effect,
Nicolai will be my consulting architect,
Of talks we had nothing but the best,
And by the posters were most impressed.
First I learnt that if I mispronounce Simionescu
Guido Majno would come rushing to my rescue.
So I will not try, & in affection call them
Maya & Nicolai.
We also heard that a violin string,
Was a basement membrane, or some such thing.
Majno showed novel observations
On smooth muscle herniations,
Maya's elegant microdomains
A lot of physiology explains,
Folkman may have the answer
To a future cure for cancer.
Of my own work I'll not speak
But I'm pleased junctions may have sprung a leak!
Haulica's rennin, extra-renal
Is even in the pineal,
Curry's talk most efficient
Made easy reflection coefficient.

The b.m. architecture glomerular
Was beautifully expounded by Farquhar,
Grotendorst in his talk
Showed cells can take a walk,

And when they really get into the act
They can even chemotact.
Nicolai had lots to tell
Of new pathways for LDL,
This news he did boldly assert
Even though he wore no shirt!
Steinberg gave a witty catechism
On lipoprotein catabolism,
Joris showed that athero in the rat
Told something new & not old that.
Velican did on us impress
How athero in man does progress.
How it's hard to know how to follow,
Since Bob, Nick & George speak tomorrow!
However I will try
And will end – by – and – by.
Wissler will make a novel synthesis
To give our thinking new impetus.
Kefalides' virus will take a bite
And give endothelium a fright,
Palade will show us where we are
And what should be our guiding star.
Gabbi's music at lunch & dinner
Didn't help to keep us thinner.
I'm sure we'd all like to come back,
But Pepe & Nicolai must get the knack
Of learning how to drive,
So their guests will survive!
You will say I'm no poet,
I must admit that I know it,
And I can tell from your faces,
That I could stop & be in stasis.
But before I do let me say
We have seen such kindness at play
And it is absolutely unique
To provide such hospitality for a week!
So let us give a standing toast
To our lovely hostess & host,
And say with heartfelt tumult

"Mulțumesc foarte mult!"

To Nicolae and Maya,

We visited Ellis Island shortly after you arrived in New York this fall. As we walked the halls of the Immigration Museum, viewed the photographs, and thought at the aspirations of the people who had left Eastern Europe to escape totalitarian regimes, I could not help but think of the two of you and of your courage in maintaining liberal thought, personal dignity, freedom of inquiry, and the spirit of creativity at your Institute in Bucharest for more than a decade despite Ceausescu's totalitarism regime. You too could have left for an easier life in the United States. But you chose a much more difficult challenge. I respect your choice and admire you for it. In saying this I am reminded of Adlai Stevenson's remarks in appreciation of Eleanor Roosevelt. "She would rather light a candle than curse the darkness", he said of her. You have not only lit a candle, but you continue to nourish and treasure it.

With good wishes for the New Year,

Sam and Jo Ann Silverstein

12 December 1992

***

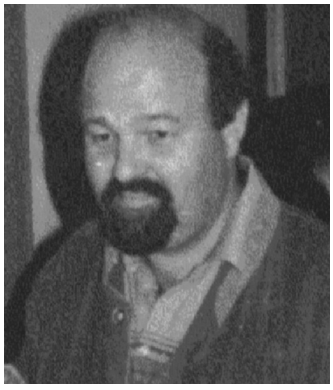
Pentru Maya și Nicolae,

Cu imensa apreciere pentru tot ce ați făcut și cu deosebită admirație pentru miraculoasa voastră reușită.
Nicăieri în lume nu găsești atâta știință adevarată, spirit elevat și mare curaj.
Voi sunteți un exemplu pentru noi toți.

Cu admirație,
Judah Folkman
Universitatea Harvard, Boston, SUA
29 august 1983

Colegilor și prietenilor mei – rare sunt ocaziile de a te bucura cu mintea și inima de plăcerea căutărilor științifice, așa cum le-am trăit în această săptămână cu voi aici în București!

Mulțumirile și afecțiunea mea.
Michael G. Gimbrone, MD.
1 septembrie 1989



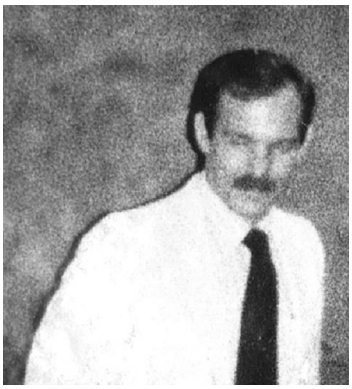
Dragă Maya,
Dragă Nicolae,

Au fost zile de neuitat: admir eforturile voastre herculeene de a construi nu numai un mare institut, ci și un centru de cercetare pentru întreaga țară.
Fie ca anii care vin să fie la fel de rodnici ca cei care au trecut.

Per aspera ad astra!

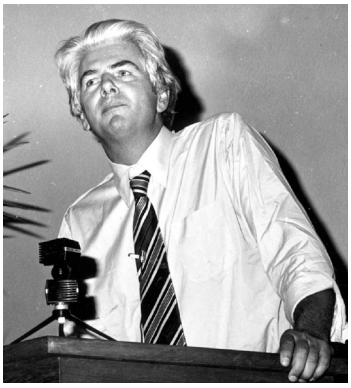
În numele unei vechi prietenii,
Cu mult respect,

Dontscho Kerjaschki
Profesor, Departamentul de Patologie,
Universitatea din Viena, Austria
3 septembrie 1989



Felicitările mele fiecărui membru al IBPC pentru dezvoltarea unui impresionant grup de oameni și de facilități de care dispune acest institut.
Recunoștința mea pentru ospitalitatea și deosebita voastră amabilitate infinită.
Fie ca aceasta să fie prima sclipire a unei stele strălucitoare.

Gary Grotendorst
Institutele Naționale de Sănătăte, Bethesda, SUA
27 august 1983



Dragilor Maya și Nicolae,

Vă iubesc - pur și simplu - și vă doresc tot ce este mai bun din toata inima.
Vă mulțumesc foarte mult pentru aceste zile minunate.

Al vostru,
Gunter Blobel
Laureat al Premiului Nobel
Rockefeller University,
New York

Pentru Maya și Nicolae,

Aceasta va rămâne una din experiențele de neuitat din viața noastră. Ați realizat un lucru de invidiat, iar comunitatea științifică este mândră de voi. Vă urăm succes continuu.

Jane și Nick Kefalides

Dragă Nicolae și Maya,
La cea de a treia vizită a mea în institutul vostru dați-mi voie să-mi exprim sentimentele de admirație și minunare pentru ce ați realizat cu colegii voștri mai tineri. Entuziasmul și dăruirea voastră pentru munca științifică sunt o forță conducătoare pentru colegii voștri mai tineri. La aceasta a X-a aniversare vă urez un continuu succes.

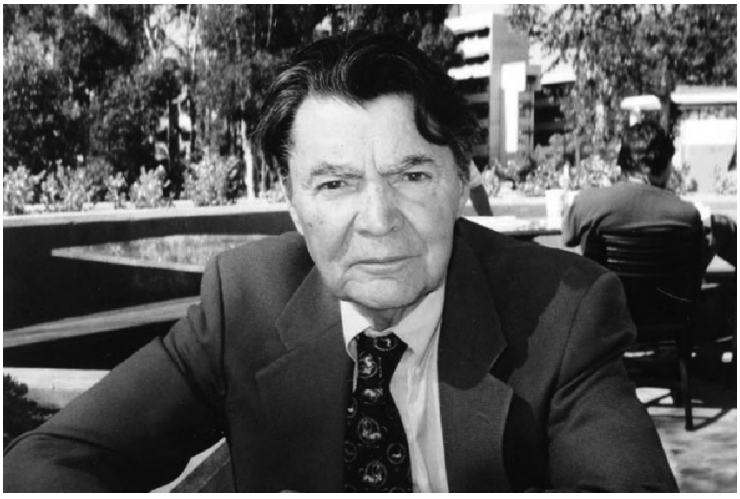
Cu toata dragostea și respectul meu,
Nick Kefalides
3 septembrie 1989

Maya și Nicolae,
Rar găsești doi oameni atât de plăcuți și de ospitalieri ca voi: doi oameni care au dăruit atât de mult din ei înșiși acestei formidabile realizări. Vizita noastră la Bucuresti și la Institutul de Biologie Celulară a fost o experiență valoroasă și atât Jane, cât și eu ne vom aminti întotdeauna de ea cu plăcere.

Nick Kefalides
Institutul pentru Studiul Țesutului Conjunctiv, Philadelphia, SUA
29 august 1983

Maya și Nicolae,
Vă știm de mult ca făcând parte din elita biologiei celulare – dar ceea ce ați făcut pentru omenire depășește cu mult granițele științei. Ați folosit celula pentru ca unul - și multe ale vise – să devină realitate sub numele de IBPC și ați fost inspirați să folosiți endoteliul ca o legătură între oameni. Într-adevăr voi v-ați dedicat viata chemării celei mai nobile – ați îmbunătățit calitatea vieții pe mica noastră planetă.

Guido Majno și Isabelle Jorris
Universitatea din Massachusetts, SUA
27 august 1983



Cu această ocazie fericită, cea de-a 20-a Aniversare a Institutului de Biologie și Patologie Celulară (IBPC) din București, doresc să felicit conducerea Institutului, cercetătorii ştiinţifici și întregul personal pentru performanţele remarcabile realizate. De-a lungul ultimilor ani, Institutul a devenit mai puternic decât înaintea schimbărilor politice care au fost în România cu 10 ani în urmă. Institutul a supravieţuit exodului unora din prima generație din cercetătorii pe care i-a format. Și, din nou, Institutul a supravieţuit dispariției fondatorului său, Nicolae Simionescu, al cărui nume îl poartă azi. Cu trecerea timpului, Institutul a dobândit o viață proprie bazată pe realizările sale trecute și actuale.

Condus de Maya Simionescu, asistată de colegii săi maturi și tineri, Institutul rămâne un centru important al cercetării biomedicale din România și un membru respectat al comunității ştiinţifice internaționale. Mai mult, Institutul promite să-și mențină poziția proeminentă actuală pentru mulți ani de acum înainte. Doresc să-mi exprim admirația pentru perseverența hotărâtoare de a lucra în Institut în timpuri grele și rămân al Dumneavoastră cu multă afecțiune.

Prof. George E. Palade
University of California, San Diego, SUA
1999

Draga Maya Simionescu,

Felicitări cu ocazia Aniversarii a douăzeci de ani de la înființarea Institutului!
Este greu de crezut că au trecut douăzeci de ani de când ne-am întâlnit la București, la Simpozionul inaugural al Institutului. Înființarea Institutului a fost ea însăși un eveniment remarcabil, ținând cont de circumstanțele politice dificile din acel timp. Pe scurt, a fost un miracol. Dar, un miracol mai mare a fost faptul că Institutul a supraviețuit și a prosperat în timp, având nenumărate contribuții în înțelegerea patologiei celulei, în special în domeniul mecanismelor bolilor cardiovasculare.
Mai mult, când Institutul a fost inaugurat, a fost gândit, de tine și de Nicolae Simionescu, ca un centru pentru competiție științifică, în care tinerii cercetători români să se specializeze la cel mai înalt nivel în domeniul Biologiei și Patologiei Celulare. Un alt record, de care, în mod justificat puteți fi mândri, și o altă vie contribuție a Institutului la viața științifică națională și internațională, sunt numeroșii tineri cercetători remarcabili, pe care i-ați format și pe care îi mai formați încă.
Eu sper ca următorii douăzeci de ani vă vor aduce chiar mai multe succese decât primii douăzeci. La mulți ani!

Prof. Marilyn G. Farquhar
Sef de Catedră la Departamentul de Medicină Celulară și Moleculară, University of California, San Diego, SUA

***

Dragi prieteni din București,

Îmi amintesc foarte bine Sesiunea Științifică din Institut, care a avut loc cu ani în urmă. Profesorii Simionescu au fost gazde excelente, nivelul științific a fost excelent, dar pentru mine aspectul cel mai interesant a fost întâlnirea cu tinerii cercetători ai Institutului. Entuziasmul, energia și pasiunea lor pentru știință a fost extraordinară. Cu toate adversitățile timpului, realizările lor au fost memorabile. Și, înfruntând toate dificultățile, Maya și Nicolae au direcționat proiectele științifice cu inteligență și inspirație, dar și cu eleganță și jovialitate, fiind un exemplu pentru fiecare din noi.
Institutul s-a dezvoltat și a prosperat în vremuri grele și în vremuri mai bune și azi este Centru de Excelență alături de alte onoruri primite.
La mulți ani la a 25-a aniversare! Să trăiți și să înfloriți!

Toate cele bune.
Cu amintiri frumoase,
Prof. Morris Karnovsky

AMINTIRI CU MAYA ŞI NICOLAE SIMIONESCU

Aniversarea a 25 de ani de la creerea Institutului de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu" este un moment important în istoria ştiinţei din România, şi din fericire, şi din cea a Revoluţiei române. Creerea acestui Institut ilustrează foarte bine ceea ce poate oferi mai bun poporul român: tenacitate, curaj, optimism şi creativitate.

Îi cunosc pe cei doi Simionescu de aproape o jumătate de secol. Maya a fost colega mea de facultate la Universitatea din Bucureşti, şi, la fel ca mine a fost victimizată la sfârşitul anilor '50, când guvernul a decis că familiile noastre sunt duşmani politici. Anii de persecuţii au continuat dar, în final noi am absolvit facultatea şi ne-am făcut carierele ştiinţifice.

Când Nicolae Simionescu s-a îndrăgostit de Maya, el era deja cercetător la Institutul de Endocrinologie şi era un nume respectat atât de comunitatea ştiinţifică română cât şi internaţională. Maya era o absolventă strălucită, dornică să înveţe cât mai mult în ştiinţă. Apoi, Profesorul George Palade Laureat al Premiului Nobel, i-a invitat să lucreze cu el la Universitatea Rockefeller din New York. Acolo i-am reîntâlnit în 1969.

Realizările şi viaţa lor împreună este o poveste romantică minunată nu numai pentru ce înseamnă dragoste, dar şi pentru dedicaţia lor pentru ştiinţa şi pentru viitorul ştiinţei în România, pentru că în acele timpuri ştiinţa nu avea nici un viitor la noi. Am venit in America prin câştigarea unei burse Roosevelt, iar soţul meu a sosit după un an. Am lăsat în urma noastră în ţară copiii, părinţii noştri şi toţi ceilalţi prieteni şi membrii de familie. În faţa noastră, în America am avut de surmontat dificultăţi, au fost lacrimi şi mult efort în anii ce au urmat, dar din primul moment am simţit că numai în America şi din America ne putem ajuta familiile să trăiască o viaţă decentă. Am discutat opţiunile noastre cu cei doi Simionescu. Ei îşi dădeau seama de lupta imposibilă pentru ştiinţa şi o viaţă decentă în România. Soţii Simionescu au avut nenumărate ocazii de a rămâne ca profesori în SUA în oricare din universităţile de elită de acolo. Au lucrat la Universităţile Rockefeller, Yale şi Columbia aducând contribuţii esenţiale la înţelegerea mecanismelor de funcţionare ale celulei endoteliale în condiţii normale şi patologice. Cercetările lor sunt esenţiale pentru progresele în introducerea de noi terapii pentru nenumărate maladii care implică modificări de tip inflamatoriu în celulele endoteliale. Lucrările publicate de ei în reviste de specialitate de renume sunt azi clasice pentru biologia celulară.

Aceste lucruri au fost apreciate în SUA, Profesorii Simionescu fiind ani la rând Profesori-invitați și realizând cercetări împreună cu colegii americani cu cele mai avansate tehnologii de investigare în biologia celulară. Conștienți de faptul că aceste tehnologii nu erau disponibile în România, ei au decis să caute fonduri pentru echiparea laboratoarelor și să clădească Institutul de Biologie Celulară pe care-l visau. Renumele lor în SUA a fost atât de prestigios încât au obținut burse pentru cercetători în scopul de a studia și a lucra în proiectele inițiate de Profesorii Simionescu în laboratoarele americane. Și apoi, cercetătorii au primit oferte pe care nu le puteau refuza: poziție, salariu bun și o viață mai bună în America.

Promisiuni care nu s-au ținut și mari probleme financiare au fost numai o parte din prețul plătit pentru a duce știința înapoi în România și pentru a creea Institutul. Final, în aceasta luptă a cedat și inima lui Nicolae Simionescu. Faima și reputația nu i-au cruțat inima, astfel încât el a plătit ultimul preț, viața sa. Maya a rămas pentru a continua lucrarea monumentală și a trece peste acestă durere. Curajul și l-a găsit din dedicația pentru memoria soțului său. Ea a continuat să facă studii eminente, unele chiar de pionierat, să publice în cele mai reputate reviste de specialitate și să competiționeze cu laboratoare de vârf din SUA și din Europa de vest.

Institutul de Biologie și Patologie Celulară ”Nicolae Simionescu” nu numai a supraviețuit, dar a devenit un Institut de prim rang. Adresa sa este: București, România nu București, Ungaria așa cum era scris pe cererile de extrase de pe lucrările mele din Nature până în 1969, când am plecat. Și astfel, istoria Institutului este o poveste minunată despre triumful dragostei și al științei asupra vicisitudinilor.

Colegi români, nu credeți că povestea lui Nicolae Simionescu și a Institutului său seamănă cu cea a Meșterului Manole? Povestiți-o vizitatorilor dumneavostră de peste hotare pentru ca ei poate vor auzi vocile care vin din pereții monumentelor noastre.

Prof. Nicole Suciu-Foca
Universitatea Columbia, New York, NY, SUA

Totdeauna trebuie să vă amintiți cât de mult depinde totul de calitatea muncii voastre. Pentru ceea ce ați facut deja aveți admirația mea deplină; pentru viitor aveți urările mele cele mai bune.

George E. Palade
Laureat al Premiului Nobel
Universitatea Yale, New Haven, SUA
29 august 1983

Pentru toți membrii institutului – multumiri pline de recunoștința pentru splendida voastră ospitalitate. Am fost foarte impresionată de progresele voastre științifice remarcabile înregistrate de la prima mea vizită, acum patru ani. Perseverați în muncă, nu vă pierdeți entuziasmul pentru că în mod cert dă rezultate.

Încă o dată, mulțumirile și admirația mea.

Marilyn Farquhar
Universitatea Yale, New Haven, SUA
27 august 1983

Către toți prietenii mei, foarte vechi, nu atât de vechi și foarte tineri din IBPC:
Puteți fi încântați și mândri de ce ați realizat în zece ani în condiții mai curând dificile. Climatul din jurul nostru se schimba. Există bune motive să credem într-un viitor – foarte apropiat – mai deschis și care să aprecieze mai mult ceea ce oamenii onești pot face în domeniul promițător în care lucrați voi. Asta înseamnă că următorii zece ani vor putea fi de asemenea memorabili. E timpul să păstrați încrederea și să mergeți inainte.

George E. Palade
Laureat al Premiului Nobel pentru Medicină și Fiziologie
Profesor Emerit al Universității Yale, SUA
3 septembrie 1989

Sunt plin de admirație pentru efortul vostru extraordinar și plin de succes de a crea o insulă de excelență științifică în România. Dezvoltarea absolut necesară a științei – atât ca valoare etică, morală, cât și culturală – și datorită importanței sale pentru progresul național – poate începe exclusiv prin tipul de Institut pe care l-ați creat. Venind din Israel, cu multe lupte interne, pot înțelege posibilele voastre momente de frustrare, dar sunt total convins că voi și colegii vostri din institut veți avea un total succes pentru binele țării voastre și a întregii umanități.

Cu cele mai calde urări,

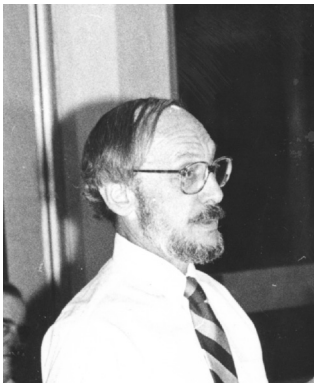
Prof. Michael Sela
Departament Imunologie,
Institutul Weizmann, Israel
7 martie 1991

Nicolai și Maya,

Calitatea vizitei contează, nu perioada de timp. Calitatea a fost excepțională, ospitalitatea și primirea foarte călduroase. Amândoi sunteți din multe puncte de vedere "părinții spirituali" ai muncii mele științifice – a fost o mare și plăcută ocazie pentru mine să discut rezultatele muncii mele cu voi și cu impresionantul vostru personal de cercetare.

Judson Sheridan
Universitatea din Minneapolis, SUA
10 aprilie 1981

Dragi prieteni,
A fost o mare plăcere pentru mine să pot fi alături de voi la cea de a X-a aniversare a institutului, să vă cunosc pe toți și să gustăm împreună din bucuria care se emană din știința de bună calitate, din discuții deschise și din entuziasmul sincer pentru celule și biologie. Ați fost cele mai bune și generoase gazde. Ați stabilit un standard foarte înalt atât în știință, cât și în omenie.
Vă urez toate cele bune pentru un succes continuu în tot ce veți face, atât personal, cât și profesional.
Sam Silverstein



Unele întruniri științifice sunt simple întâlniri de afaceri, dar aceasta a emanat căldură, generozitate, prietenie și ȘTIINȚĂ ADEVĂRATĂ.

Multumesc,
Dan Steinberg

MĂRTURIE PENTRU UN VIS DEVENIT REALITATE: INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ "ACAD. PROF. DR. NICOLAE SIMIONESCU"

1979. Într-o dimineață, pe o vreme plumburie ca și vremurile de atunci, Dr. Constantin Velican mi-a spus: "Vino să-ți arăt cum se înfiripă un miracol!". Cu scepticismul celui care, de la Eminescu citire, știa că "minuni în vremea noastră nu cred a se mai face", am ajuns în Str. B. P. Hașdeu, la nr. 8.

O clădire mare, aparent impersonală, în care, pe culoare și pe scări erau grămezi de moloz și, ca într-un joc al umbrelor, era un du-te - vino de lucrători, cu saci de nisip în spate și cutii de vopsele în mâini. Într-o cameră mică, în semiobscuritate, printre lăzi și cutii nedespachetate, ne-a întâmpinat Dr. Neacșu, care a pus pe o măsuță un sul de hârtie grosieră și ușor cafenie. Părea că provine de la ambalajul unui aparat.

Dupa câteva minute, sulul de hârtie desfășurat s-a însuflețit și au început să apară linii, schițe, notițe, scrise în toate sensurile. Ni s-a spus: "Acestea sunt planurile trimise de Prof. Nicolae Simionescu și Maya, pentru viitorul Institut de Biologie și Patologie Celulara". Brusc, camera parcă s-a luminat și, undeva, departe, am văzut cu ochii minții silueta unui edificiu și a unei instituții moderne, dedicată cercetării științifice, așa cum visam cu toți.

Au trecut ani și prin eforturile uneori sisifice, ale fondatorilor, Institutul a prins viața. Aparatura de înaltă tehnicitate și-a găsit locul în camerele, acum luminoase și vesele că sunt "locuite" de tineri, recrutați dintre cei mai buni absolvenți ai Facultăților de Biologie, Biochimie, Fizică ș.a. Trimiși la specializare în institute și centre de cercetare renumite din toată lumea, acești a se întorceau acasă pentru a contribui la dezvoltarea științei românești.

În amfiteatrul cu scaune tapisate într-un galben luminos, dătător de speranțe, s-au perindat figuri ilustre ale comunității științifice internaționale, unele purtând aura premiilor Nobel. Au putut fi audiate prelegeri și cursuri, lucrări, prezentate de Profesorii George Emil Palade, Christian de Duve, Guido Majno, Isabel Joris ș.a.

Conferințele internationale organizate cu periodicitate regulată, Sesiunile Anuale ale Institutului au fost adevărate sărbători care au reușit să pună în vibrație comună pe cei din afară cu cei din țară.

Dorind să formeze "creatori de știință, sensibilizati și fertilizați prin cultură" (cuvântul Acad. Nicolae Simionescu la comemorarea lui Eminescu în 1989), Profesorii Nicolae și Maya Simionescu au ținut strânsă echipa institutului și pe prietenii lor și cu prilejul aniversărilor culturale, al sărbătorilor naționale și personale.

…Dar, "mult prea repede trecătorul timp" nu iartă. Barca institutului, care

înainta cu vântul în pânze, a pierdut unul din cei doi timonieri. Cel rămas, Acad. Maya Simionescu, păstrând durerea pentru sine, și-a strâns puterile și a tinut ferm și drept drumul institutului.

Hans Selye spunea: "Pentru a face un vis frumos să devină realitate, prima condiție este aceea de a avea o mare capacitate de a visa; a doua este perseverența, adică încrederea în vis".

Institutul de Biologie și Patologie Celulară "N. Simionescu" a avut șansa ca fondatorii săi să-i așeze la temelie aceste două prețioase pietre.

"La mulți, mulți ani !"

Dr. Doina Velican
Membru al Academiei de Științe Medicale

***

CLIPE DE VIAȚĂ

Institutul nostru împlinește douăzeci și cinci de ani!

Acest loc a reprezentat și reprezintă "o instituție de cultură în care se face știință", așa cum preciza cel al cărui nume este intrinsec legat de Institutul de Biologie și Patologie Celulară, Profesorul Nicolae Simionescu. Institutul a fost și este un act de patriotism real împlinit prin prestigiul științific, dăruirea și entuziasmul fără limite al fondatorilor săi, Profesorii Nicolae și Maya Simionescu. Totodată, Institutul este o școală modernă de instruire avansată a tineretului și specialiștilor în biologie și patologie celulară; numeroși studenți, masteranzi și absolvenți (din țară, SUA și Spania) și-au efectuat tezele în laboratoarele noastre, inclusiv tezele de doctorat în biologie celulară.
Institutul a fost și un loc de refugiu în fața problemelor vieții de zi cu zi, în timpuri grele, când în liniștea și calmul laboratoarelor ne concentram asupra experimentelor menite să descifreze mecanismele implicate în funcționarea endoteliului vascular în condiții fiziologice, iar pe ecranul microscopului electronic observăm căile de transport operante în celulele peretelui vascular și încercăm să înțelegem modificările apărute odată cu instalarea patologiilor cardiovasculare. Așteptam cu neliniște să vedem cum "au ieșit" gelurile, transferurile, radiomarcările, fotografiile de microscopie, etc. și ne desprindeam de mediul înconjurator într-o oază aducătoare de satisfacții științifice și cu potențial de întelegere și apoi de redresare al maladiilor cardiovasculare atât de frecvente în populația afectată de stress.
Institutul a fost, este și va fi o șansa de realizare profesională pentru fiecare. Am competiționat la selecția de candidați pentru specializare în biologie celulară realizată de Profesorul Nicolae Simionescu înainte de înființarea Institutului și am avut șansa de a fi selectată ca bursier Fullbright. Universitatea din New York, Departamentul de Biologie Celulară a fost locul ideal ales de Domnul Profesor, pentru a-mi însuși metodologia, sistemul de lucru, stilul de seminarii, etc în vederea îndatoririlor mele

odată cu deschiderea Institutului.
Mă văd păşind pentru prima oară în clădirea din Str. Haşdeu nr. 8; era încă şantier, cu... 13 persoane angajate înaintea mea. Domnul Profesor mă primeşte în birou şi-mi spune să mă instalez la etajul II în laboratorul mare, de care urmează să mă ocup. Urc scările şi descopăr etajul cu faianţa bleu, intru în toate laboratoarele cu ferestre şi podele încă pline de var şi aleg care este laboratorul cel mai mare. Dar, nu sunt sigură că am nimerit bine şi... mai urc un etaj. Nimeni în jur. Descopăr faianţa vernil peste tot, dar niciun laborator nu este de mărimea celui anterior stabilit. Deci, la etajul II îmi este locul! Ce voi urma să fac aici: organizarea laboratorului de biochimie preparativă, supravegherea funcţionării optime a scintilatoarelor, ultracentrifugilor, susţinerea de seminarii metodologice, etc.
Primul an, primele seminarii. Pregătim scurte rapoarte asupra progreselor temei fiecăruia. Ne străduim să fie cât mai temeinic fundamentate în contextul literaturii şi susţinute de rezultatele obţinute; discuţiile sunt conduse de Domnul Profesor şi orientate cu precădere spre sublinierea elementelor de noutate şi a direcţiilor imediate de cercetare. Domnul Profesor cunoştea perfect literatura, în cel mai mic detaliu, inclusiv numele autorilor, avea un talent desăvârşit în moderarea discutiilor (unele foarte aprinse) şi stârnea curiozitatea ca nimeni altul...Plecam din seminarii cu dorinţa ca noaptea să treacă cât mai repede, iar a doua zi să încerc să experimentez ideile care mi-au fost sugerate sau observaţiile făcute.
O împrejurare, o metodă de lucru care azi nu mai este "en-vogue", dar de care este absolută nevoie, un caiet vechi de lucru, un anume ac-fluturaş din trusa de micro-chirurgie, etc. mă fac să-mi aduc aminte de clipe trecute şi să le povestesc apoi tinerelor mele colaboratoare.
Este iarna şi aproape 9 seara, afară ninge cu fulgi mari; la sala de operaţie Doamna Maya ne învăţa cum să perfuzăm plămânul unui şobolan şi să-i îndepărtam sângele cu soluţie tampon cât timp animalul respiră încă; reuşita nu este perfectă, fie plămânul rămane "roz", fie spargem bariera sânge-aer şi în plămân se formează edeme. În disperare, Doamna Geogescu (tehnician de la biobază) ne atenţionează că nu mai putem să tot încercăm - avem în mână "ultimul şobolan", ultima şansă... De atunci s-au perindat mulţi şoareci şi hamsteri pe masa noastră de microchirurgie, iar plămânul a fost perfuzat cu succes. Studiile "in situ" asupra căilor de transport ale albuminei (glicată reversibil sau ireversibil) în endoteliul capilar pulmonar şi modificările acestui pat vascular în diabetul (experimental) au fost publicate în reviste prestigioase din străinatate şi în monografii internaţionale.
Alte amintiri... Nicu vrea să izoleze peroxidaza din hrean. Se cumpără hreanul, Marcela îl curaţă cu şiruri bogate de lacrimi şi se începe mărunţirea lui cu tocătorul de la "Cafeterie". De atâta tocat, maşina se încălzeşte peste măsură, i se rupe cuţitul şi final, coada... spre hazul nostru general...
Virgil apare în uşă "office"-ului meu cu un ochi vânăt, reclamând că l-a lovit Doctorul Neacşu! Eu nu cred în ruptul capului şi, după argumente pro şi contra, recunoaste că a fost o glumă... proastă şi că s-a vopsit singur cu cerneală ca să mă sperie!

Și, tot iarna, la Pomul de Crăciun, prima întâlnire cu copiii colaboratorilor... fascinați mai puțin de barba de vată a lui "Moș Gerilă", cât de scaunele noastre cu rotile, pe care le împing pe toata lungimea laboratorului și de scaunele cu șurub, înălțate până la limita periculoasă a deșurubării complete.

Doi iunie 1982, este data înființării Societății Naționale de Biologie Celulară (SNBC), o altă inițativă a Profesorului Nicolae Simionescu. Societatea (afiliată la cea Europeană) a avut și are drept scop promovarea progreselor științifice în domeniul biologiei celulare și moleculare, normale și patologice, organizarea și dezvoltarea în țara noastră a cooperării multidisciplinare specifice acestui domeniu, sprijinirea cercetăilor fundamentale, de largă perspectivă. A fost nu numai o cinste, dar și o mare bucurie să îndeplinesc funcția de Secretar al SNBC timp de... 12 ani. Și acum, după 22 de ani, colaboratorii mei de la filiale mi-au devenit buni prieteni, unii chiar colaboratori.

Anii '85-86: ne mutăm cu laboratorul la parter. Aici este mai însorit și laboratorul mai mic. Se produce prima rocadă, locul lui Șerban, Monica și Rozi este luat de Nicu, Mircea, Junona și Mirela. Din când în când, Domnul Profesor lucrează în "office"-ul alăturat, unde este soare în zilele senine. Trebuie să fim atenți să nu râdem prea tare și să-l deranjăm; dar, de fapt, profităm de dânsul, batem la ușă și-i întrerupem (nepoliticos) gândul cu de-ale noastre...

Discuțiile cu caietul de experimente în față ghidate cu infinită răbdare și exigență competentă de Doamna Maya oferă alternative de urmat, soluții eficiente, realizează un adevarat "brain storming" și oferă o satisfacție intelectuală aparte, la fel ca și azi.

Este din ce în ce mai frig în Institut. Lucrăm acum îmbrăcați cu costumele de ski destinate inițial folosirii în camerele reci. Soluțiile de detergenți pentru electroforeză sedimentează; căutam alternative de reactivi stabili la temperaturi în jur de 100 C. Dilema însă persistă pentru că rezultatele din literatură sunt raportate la "temperatura camerei", care cert este peste cea din jurul nostru... însă, Junona calmă își pune la picioare un resou adus de acasă și, cu căștile la urechi își perfecționează impasibilă... limba engleză.

Tot în anii '85-86, este august și noaptea se produce un cutremur. Telefoanele sunt întrerupte, pe străzi este un haos de mașini și oameni. Pornesc pe jos în viteză spre Institut și desfășor în minte scenarii care de care mai teribile. La Institut, calm... cele câteva cioburi de la cilindrii le măturase deja Relu.

Anii '90. Se fac interview-uri pentru noi angajări. S-au înscris deja 17 persoane, dar... la interview descopăr după lungi căutari una singură, o tânară mignonă, cu aspect de fetiță speriată, îmbrăcată în roz. Este Gabi, cea care va face o impresie deosebită, va fi angajată și este azi Doctor în biologie celulară și unul din pilonii generației următoare a Institutului.

Se produce un alt cutremur, de astă dată în cursul zilei: Nona iese speriată de la microscopul electronic, eu fug în curte, etc. Numai Domnul Profesor rămâne în biroul său și... dă telefoane familiilor noastre, asigurându-le că totul este în regulă: Institutul rezistă, noi suntem bine... așa cum este și azi, dar numai Dânsul nu mai este... Sunt sigură însă că a rămas în biroul său, cu toate cutremurele mai mari sau mai mici și încă

lucrează spre binele nostru.
Urmează o a doua rocadă; locurile de la mesele de lucru sunt acum ocupate de Adriana, Alina, Gabi și... de computer, iar alte două noi locuri de Nicoleta și Mădălina. Ele sunt schimbul nostru, generația ce formează azi peste 30% din cercetătorii Institutului. Dar, cum vedeți, sunt numai fete... iar când vreun dop se încăpățânează să iasă, colegele mele insistă să mai vina și o mână bărbătească alături... Acum sunt alte aparate la concurență acerbă - termocycler-ul PCR, aparatul de RT-PCR, microscopul inversat computerizat, miograful... se fac programări cum se făceau înainte la "tăiere la microtom" și la microscopul elecronic! Alți actori (cercetători), aceeași scenă (Institutul), ducând mai departe făclia pe care ne-au îndemnat să o purtăm cu seriozitate, rigurozitate și nesfârșită dăruire Domnul Profesor și Doamna Maya.
Când scriu aceste rânduri este primavară (iar). Un pițigoi cu penej albastru superb vizitează mugurii corcodușului de la geamul "office"-ului meu. Din când în când vine și pe pervazul ferestrei. Se uită poate la florile albe primite la ziua mea și care au făcut rădăcini în Berzelius-ul în care le-am pus. Le plantez afară în grădină. Știți unde? într-unul din "coated-pits" de lângă buturugile-scaunele. Sunt sigură că vor înflori și la anul! La mulți ani I.B.P.C.!

Dr. Doina Popov
Membru corespondent al Academiei Române

***

LECȚIILE D-LUI PROFESOR

Aduceri aminte și reflecții. Imagini persistente în memorie. Gânduri care recompun perioada de început, dominată de personalitatea d-lui Profesor Nicolae Simionescu. Au fost „LECȚIILE D-LUI PROFESOR".

NAȘTEREA UNUI CERCETĂTOR - ATRIBUIREA TEMEI DE CERCETARE

Noul venit trece printr-o perioadă de probă de 6 luni și se familiarizează cu tehnicile și temele din toate laboratoarele Institutului. Apoi, «marele moment»: fiecare dintre noi este chemat la D-l Profesor care decide laboratorul unde ești repartizat, colegul cu experiență cu care vei lucra și, poate cel mai important lucru, tema proiectului pe care urma să îl realizezi.
Tema mea se intitula «Izolare, cultivare și metabolism al celulelor endocardice». Entuziasm, dar și putină teamă. Știam că acest tip de celule nu mai fuseseră cultivate, exista puțină literatură în domeniu și trebuia multă muncă și imaginație pentru a realiza proiectul. D-l Profesor a stabilit câteva puncte de plecare, idei despre modul în care puteam să abordez subiectul. Am pornit la drum cu încredere și nerăbdare la ideea «minunilor» pe care urma să le descopar.
Pentru mine, ca și pentru mulți dintre noi, Institutul a început să devină un mod de viață. Ne-am maturizat o dată cu Institutul și am contribuit la evoluția Institutului.

PRIMII PAȘI AI UNUI CERCETĂTOR – SEMINARIILE ȘTIINȚIFICE

Trimestrial, fiecare dintre noi trebuie să prezinte un raport de cercetare în cadrul unui seminar științific. Raportul urmează să fie „validat" de colegi și, cel mai important lucru, de către D-l Profesor. Seminariile sunt adevărate lecții privind modul de prezentare a rezultatelor cercetărilor noastre. Toți ne străduim să le pregătim cât mai bine ca să putem face fața întrebărilor colegilor și, bineînțeles, ale D-lui Profesor. Întrebările D-lui Profesor le aștepți cu neliniște. Ele te aduc la limita de cunoaștere la care ești și pe care trebuie să o depășești, te fac conștient de locul tău, în acel moment, în evoluția științei.

La finalul fiecărei prezentări, D-l Profesor ține o lecție de biologie celulară în care integrează rezultatele prezentate și evidențiază posibile dezvoltări ale proiectului. Definește drumul pe care trebuie să mergem în continuare și ne arată perspectivele pe care, fiind la început de drum, noi nu le întrevedem. Sugerează fiecăruia cum să continue proiectul și ce mai trebuie completat pentru ca în final să se poată realiza o lucrare științifică valoroasă.

Pentru unii dintre noi seminariile se termină în lacrimi sau revoltă atunci când nu putem să răspundem la câte o întrebare esențială pentru tema prezentată, întrebare care verifică în detaliu cunoașterea „obiectului de studiu". Indiferent de reacție, în final fiecare realizează că D-l Profesor are dreptate.

MATURITATEA UNUI CERCETĂTOR – LUCRĂRILE ȘTIINȚIFICE

Orice material științific trece pe la D-l Profesor. Este analizat la „sânge" și noi așteptăm rezultatul cu nerăbdare. Profesorul impune anumite standarde care treptat devin obișnuință. Ne obligă continuu să ne documentăm cât mai mult, să ne „gândim" experimentele cât mai profund, să le înțelegem cât mai bine, să lucrăm cât mai corect, să fim cât mai onești în interpretarea rezultatelor, să fim decenți în prezentarea concluziilor lucrărilor noastre, să integrăm rezultatele în teorii generale și să continuăm drumul pe căile cele mai potrivite.

Lecțiile D-lui Profesor sunt aprofundate cu fiecare „eveniment" trăit de noi în Institut: discuțiile despre temele de cercetare și lucrările ce urmau să fie publicate sau prezentate, rapoartele de cercetare trimestriale, examenele, sesiunile științifice naționale și internaționale. Cu timpul, pregătirea noastră științifică ne-a ajutat să fim mai aproape de statutul unui cercetător de valoare, așa cum Dl Profesor ne dorea să fim.

Gândindu-mă la „Lecțiile D-lui Profesor" înțeleg mai bine ceea ce spunea Albert Einstein: „Lucrul cel mai minunat cu care ne putem întâlni este misterul. La baza artei și științei adevărate se află emoția primară. Cel care nu știe acest lucru și nu mai poate fi curios sau simți uimire este ca și mort, asemenea unei lumânări stinse". Realizez că aceste cuvinte exprimă foarte bine ceea ce gândea și încerca să ne transmită și nouă D-l Profesor, care, cu toată forța personalității sale a reușit să ne facă să existăm în știință și în viață asemeni unor lumânări aprinse, uimiți și curioși la „minunile lumii în care trăim", dornici să-i descifrăm misterele cu mintea și sufletul. A făcut acest lucru

demonstrându-ne prin propriul exemplu că se poate, mobilizându-ne cu o tinerețe și o energie inepuizabile să ne depășim limitele, să aspirăm către mai mult și mai bine, să încercăm să ne apropiem de standardele înalte pe care le impunea D-l Profesor.
După trecerea în neființă a D-lui Profesor, Institutul de Biologie și Patologie Celulară a devenit Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu". Acum Institutul este condus cu succes de cea care i-a fost mereu alături în știință și în viață, D-na Maya Simionescu. Sub coordonarea Dnei Maya am fost selectați, prin competiție, Centru de Excelență al Comunității Europene. Continuăm drumul în spiritul a ceea ce deseori spunea D-l Profesor: „Nu se poate construi nimic durabil, dacă în materialul de construcție nu este adăugat «quatum satis», suflet. Fără dăruire nu poți deveni niciodată ceea ce admiri".

Dr. Ileana Mânduțeanu

***

Nu avem norocul să fim prezenți (fizic) la a 20-a aniversare a Institutului. N-am avut șansa să fim nici la fastuoasa Inaugurare de acum douăzeci de ani. Dar am avut norocul să recităm elegii la împlinirea primăvăraticei vârste de 5 ani și să participăm la a 10-a aniversare, încrustată în sclipirea de fulger a unui diamant.
Am știut oare atunci la ce evenimente asistăm? Aveam cu siguranță intuiția că se întâmpla ceva deosebit. Și, într-adevăr, în acei ani se întâmpla ceva unic. Toate erau evenimente, adevăratele evenimente ale vieții noastre și ale științei românești: și conferințele internationale, și sesiunile SNBC, și seminariile din IBPC. Și pluguşoarele, și excursiile, și plecările, și venirile Dvs. din străinătate.
Pe plan personal, tot evenimente au fost și șansa de a fi contemporani cu Institutul, de a fi acceptați în procesul de selecție, și aceea de a putea fi angajați în IBPC în acele vremuri tulburi. Sau de a ne mândri cu câte un "abstract" la sesiunile din septembrie, iar mai târziu, cu câte o lucrare pe care am avut onoarea ca și Dl. Profesor să-și pună semnătura.
Pe atunci, chiar a ne întâlni cu Domnul Profesor pe coridor era un eveniment...! Sau de a vă vedea mașina în curte, pe geamul laboratorului de la parter... Sau aceea de a răsfoi, din întâmplare, la sala de consiliu, lucrările Profesorului din tinerețe, sau note din perioada de la Endocrinologie.
Aveam atunci, atât admirația discipolilor care încearcă să înțeleagă secretul devenirii unei celebrități și să "fure" ceva din componența magică a Maestrului, dar și jena comiterii unei vagi indiscreții... Oricum, psihanaliza ar putea explica multe din elanurile noastre de atunci și mai ales încăpățânările și ratările multora dintre noi, care ne concuram în a căpăta atenția și aprecierea "tatălui". Ce naivi eram! Abia acum, când noi înșine suntem părinți, înțelegem că ne iubea pe toți, chiar atunci când ne arăta bățul...

Profesorul a fost el însusi un Eveniment, o apariție singulară în istorie.
El singur a avut puterea să-i contrazică pe marxiști la ei acasă: nu masele amorfe fac Istoria, ci personalitățile. Fie că ele se numeau, așa cum ne-a învățat aniversând chiar în școala de Biologie Celulară de pe chei, pe Eminescu, pe Iorga, pe Brâncuși, fie că erau Palade sau... Simionescu.
Azi, a fi fost „from Simionescu's Institute" e un pașaport transatlantic.
Dacă peste încă zece, cincizeci, sau o sută de ani va mai ști cineva din lume unde este București-ul pe hartă (fie ea și harta științei), asta va datora mult Institutului, Domnului Profesor și Dumneavoastră.
Obosit de o lume prea mică pentru el, Profesorul se odihnește la temelia Institutului.

Veșnică recunoștință Domnule Profesor...
La mulți ani, IBPC!

Nicanor și Leni Moldovan
Heart and Lung Institute, University Medical Center,
Ohio State University, Columbus, USA
1999

***

ÎNCEPUTURI

Nu avusesem până atunci un MENTOR. Până în ziua de 26 mai 1979 când am intrat prima oară, cu emoții și speranțe, în cabinetul PROFESORULUI. Nu știam că în acea zi, când mi-a fost acceptată intrarea în Institut, va începe creșterea mea - profesională, umană, morală. Am simțit însă foarte curând că uriașa personalitate, blândă și exigentă, de o statură științifică impresionantă, mă va determina să rămân definitiv legată de Institut.
Cu o forță de granit, neînduplecat, luptându-se cu toate cozile de topor, construia, crea, plămădea Institutul sub ochii noștri. Nu i-a fost ușor. Nici nouă. Dar această "AVENTURĂ" a creat miracolul. Îi invidiez puțin pe cei tineri care au găsit aici o instituție matură, cu un solidificat prestigiu național și internațional. Dar am totodată și o ușoară părere de rău pentru ei, pentru că nu au participat la ÎNCEPUTURI. Nimic nu se compară cu începuturile. În bezna dictatorială de atunci, veneam la Institut ca fluturii spre lumină. Uitam să mai plecăm, angajându-ne în dispute aprige în timpul seminariilor, până la 8-9 seara. Rămâneam în Institut nopțile dinaintea sesiunilor științifice. Bântuiam pe coridoare și prin laboratoare, mânjiți de lipici, certându-ne pentru o bucată de carton și radiind de fericire la fiecare poster terminat. Totul trebuia să fie perfect, nici o literă strâmbă, nici un colț dezlipit. Nu pentru alții, pentru noi. Am învățat asta. Ne strângeam grămadă în jurul meselor de la bibliotecă și făceam claca la alegerea literelor de plastic pentru titlurile de la postere. În unele duminici ne căram și copiii după noi. Fetița mea de 5 ani se rătăcise într-o zi pe coridoare. "Unde

te duci, Diana?" "Mă duc... la familia aceea de la bibliotecă..."
Eram o FAMILIE. O familie mare, cu necazurile și bucuriile ei, cu lupta perseverentă pentru a putea exista, cu luminoasele ei satisfacții. De multe ori – puțini știu – ne-a fost amenințată existența. Capul familiei, PROFESORUL, a știut să lupte și să ne conducă spre realizări considerate atunci utopice, imposibile. Astăzi suntem un arbore cu rădăcinile bine înfipte în pământ. E greu să tai un arbore. E greu, e păcat și până la urmă inutil, pentru că rădăcinile bine înfipte în pământ dau întotdeauna lăstari și muguri primăvara.

Dr. Nona Constantinescu

***

Domnule Președinte al Academiei Române,
Stimați colegi,
Doamnelor și Domnilor,

Doresc, în primul rând, să vă mulțumesc pentru invitația ce mi-a fost adresată de a participa la Sesiunea Științifică Aniversară - Institutul de Biologie și Patologie Celulară "N. Simionescu" la 20 de ani - și să vă mărturisesc cât de bine mă simt astăzi și ori de câte ori, mă aflu în mijlocul acestui harnic colectiv care activează în Institut și care se bucură de un bine-meritat prestigiu în țară și peste hotare. Cu 20 de ani în urmă, Profesorul Nicolae Simionescu și soția sa Maya Simionescu, care visaseră demult un asemenea Institut, s-au străduit să transforme visul în realitate. Și nu le-a fost deloc ușor. Dar în cele din urmă au reușit, punând într-însul mult suflet. Suflet din sufletul lor. Din păcate soarta nemiloasă l-a răpit prematur pe distinsul Academician Nicolae Simionescu, pe atunci Vicepreședinte al Academiei Române și Director al Institutului, lăsând în urma lui un mare gol, greu de împlinit. Dar, potrivit cuvintelor lui Horațiu "Vasul păstreaza multă vreme mireasma de care s-a pătruns mai întâi", sperăm ca Institutul de Biologie și Patologie Celulară "N. Simionescu" să păstreze multă vreme mireasma spiritului marelui om de știință care a fost Nicolae Simionescu și al cărui nume îl poartă.
Acum 20 de ani, un vrednic colectiv, format din oameni de știință de o înaltă competență, cu o bogată experiență și din tineri entuziaști, dornici să se afirme, porneau împreună pe un drum nou, nebătătorit încă. Cele două generații au conlucrat excelent, într-un veritabil spirit de echipă. S-a lucrat mult. S-a lucrat cu pasiune și dăruire, de dimineața până seara, și adesea, până târziu în noapte. S-a lucrat cu plăcere și roadele n-au întârziat să se arate. În întâlniri internaționale de lucru, cercetătorii Institutului au putut constata cu satisfacție că pot purta discuții, practic, vorbind de la egal la egal, cu prestigioase personalități ale biologiei și patologiei celulare mondiale și că rezultatele obținute de ei prezentau interes pentru aceste presonalități, fapt care a avut un efect tonic. Le-a dat mai multă încredere în propriile lor forțe și curajul

necesar pentru a merge mai departe pe drumul atât de spinos, dar totuși atât de frumos, al cercetării științifice. Fără îndoială, meritul mare al Institutului este acela de a fi dat la iveală noi secrete ale naturii în domeniul biologiei și patologiei celulare, dar tot atât de important mi se pare și faptul că Institutul a devenit o școală în care se formează și se desăvârsesc noi specialiști în acest domeniu. Și când subliniez acest merit, îmi vine fără să vreau, în minte, un vechi proverb chinezesc, potrivit căruia "Dacă oferi unui om un pește el se va hrăni o dată, dar dacă îl înveți să pescuiască el se va hrăni întreaga viață".

În încheiere, vă rog să-mi permiteți să urez Doamnei Academician Maya Simionescu, Vicepreședinte al Academiei Române și Director al Institutului de Biologie și Patologie Celulară "N. Simionescu", precum și tuturor celor care activează în acest institut, sănătate deplină, tinerețe spirituală, noi și remarcabile succese în descoperirea secretelor vieții, în acestă dificilă, dar frumoasă confruntare cu necunoscutul. Fie ca, în spiritul celebrului vers al lui Horațiu "Exegi monumentum aere perennius" rezultatele cercetărilor Institutului să se impună și în viitor pe plan mondial, ca un impresionant monument de știință, în slujba omului, mai durabil decât bronzul.

Vivat, crescat, floreat
Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"!

Academician Radu Voinea
Președinte al Secției de Științe Tehnice al Academiei Române
1999

***

AȘA CUM A FOST

De regulă, luni dimineața, Domnul Profesor dorea să știe cam ce avem de lucru la grafică pentru săptămana în curs. După ce puneam "țara la cale", de la un timp mă întreba dacă am urmărit emisiunea de sâmbătă după amiază. Pentru mine acea emisiune era un regal al sufletului alături de Iosif Sava. Generosul amfitrion mă prindea în mrejele pasiunii lui pentru muzică și cultură. Mă capta cu entuziasmul lui mai ales atunci când aducea în fața telespectatorilor un tânăr pe care-l investiga cu cel mai iscusit talent. Se bucura sincer când descoperea în interlocutorul său o persoană care rezista "hărțuielilor". Se ambala, se entuziasma, uneori exagera, dar era totuși minunat și toată vibrația emoției lui trecea dincolo de ecran. Eu eram fascinată de acest magician. Domnul Profesor se amuza de impactul pe care-l avea asupra mea, mă tachina puțin, apoi plecam la treburile mele. O dată ieșită pe ușa cabinetului său, ziua de luni căpăta o anumita aură. Cred că pentru fiecare dintre noi Domnul Profesor avea un "buton de reglaj fin" cu care să te ajute să rezonezi cu ceea ce urma. Reușise să mă determine să-mi doresc să aflu cât mai multe despre ceea ce reprezentau diagramele sau fotografiile de microscopie unde evidențiam prin diferite semne si săgeți miracolele care se petreceau în structurile respective și, nu cred să

fi fost cineva din institut care să nu aibe habar de ceea ce se petrecea între pereții lui. Până și o anostă ședință de sindicat se transforma într-o disertație științifică. Acolo vorbea pe înțelesul tuturor. Toți aflam cum e structurată baza de cercetare a institutului și cam ce face fiecare cercetător. Uneori măi apela la câte o pildă, dojenind delicat pe câte cineva, dar tot ce spunea era gândit ca activitatea în totalitatea ei să se desfășoare armonios. Nu-i plăceau stridențele, nu îngăduia duritatea, dar cultiva seriozitatea și fermitatea. Era altfel. Se impunea prin exemplul personal: de la ținută până la impactul fiecărui cuvânt adresat cuiva. Era de o punctualitate exemplară și atunci când programa pe cineva la o discuție și atunci când participa ca invitat. La fiecare eveniment științific nu pregeta să amintească de problemele societații noastre și să puncteze importanța implicării fiecăruia dintre noi la bunul mers al cetații. Era preocupat să transmită mereu mesaje ce puteau penetra crusta de egoism și indiferenta care sălășluia pe conștiința oamenilor.
Va rămâne pentru cei ce au avut șansa să-l fi cunoscut un punct incandescent în constelația sa.

Corina Neacșu

***

DIN AMINTIRILE UNUI CERCETĂTOR

…Se petrecea la un început de februarie, în urmă cu aproape 13 ani, mai exact pe 13 februarie 1996. Mă aflam în laboratorul "Disfuncții vasculare în Diabet" și emoția mă cuprinsese deja. „Cum va fi?" mă întrebam.
Mi se oferise posibilitatea, ca în urma unui interviu riguros cu Doamna Doctor Felicia Antohe, iar după aceea chiar cu Doamna Academician Maya Simionescu, să mă dedic cu totul cercetărilor științifice. Știam că fizicienii au fost cei dintâi care au abordat analiza conceptului de viață, dar mă temeam de necunoscut, de capacitatea sau incapacitatea mea de a face performanță într-un domeniu nou. Priveam nedumerită în jur, toți erau preocupați de munca lor. Dar, toate aceste temeri au dispărut pe masură ce mă integram în colectivul laboratorului nostru, printre colegii din Institut. Coordonatorul laboratorului în care am fost repartizată și în care sunt și acum, Doamna Doctor Doina Popov, a căutat cu toate prilejurile să-mi stimuleze interesul pentru munca de laborator, pentru inițierea în cercetarea științifică. Am învățat cum se abordează o problema de cercetare, cum se redactează o lucrare științifică, un proiect de cercetare. Ne-am bucurat și ne-am întristat împreună atunci când primeam întrebările și răspunsurile la articolele trimise spre publicare. Și astăzi suntem copleșite de aceleași emoții.
Au urmat perioada doctoratului și examenele de promovare. Am avut astfel șansa să o cunosc mai bine pe Doamna Academician Maya Simionescu. La examene era exigentă, fără să fie dură. Cu cât răspunsurile erau mai bune cu atât întrebările erau mai dificile. Se urmărea întotdeauna logica și judecata, corectitudinea și rigurozitatea

rezultatelor obținute. La fel se urmăresc și astăzi.
Îmi amintesc că la prezentarea tezei de doctorat Doamna Academician era emoționată la fel ca și mine. Discursul ținut mi-a arătat că reușise să vadă dincolo de aparențe, să cunoască omul din lăuntrul lui, să-l înțeleagă.
Am avut șansa ca sub aceeași îndrumare să-mi desfășor activitatea și în continuare, după terminarea doctoratului, în același laborator, în preajma acelorași oameni.
În toți acești ani am înțeles că în activitatea de cercetare nimic nu este impus, nici în privința temelor de cercetare nici a programului, totul decurge firesc. Firească mi se pare și prezența spiritului Domnului Profesor Nicolae Simionescu în laborator, în Institut. Tabloul cu portretul profesorului pe care l-am găsit la venirea mea în laborator, mai poate fi văzut și astăzi. Uneori am senzatia că mă urmărește cu privirea și simt o mare responsabilitate pentru tot ceea ce fac.
...Anii au trecut și mă încearcă nostalgia pentru momentele frumoase petrecute alături de colegi; mărturisesc că un edificiu multiform mi se pare acest templu al științei, iar cu totul diferiți sunt oamenii care îi trec pragul și diferite sunt forțele sufletești care îi conduc la acest templu.

Dr. Adriana Georgescu

***

Ușa Institutului s-a deschis pentru mine în anul 1994. A doua zi după examenul de licență plecasem de acasă cu gândul să-mi depun CV-uri pentru angajare la toate institutele din jurul facultații de biologie. Am intrat mai întâi la IBPC, pentru că în timpul examenului de licență văzusem pe tablă un anunț de angajare în IBPC pentru proaspeți absolvenți. Am dat interviu cu doamna dr. Ina Heltianu și mă pregăteam să plec și la celelalte institute. O ploaie de vară m-a întors din drum și n-am mai ajuns niciodată la celelalte institute! Trecusem de prima etapă de selecție și urma să mă prezint la interviu cu Profesorul Simionescu. În ziua interviului aveam mari emoții, fiindcă auzisem de personalitatea Profesorului. Gândeam că voi întâlni omul de știință afundat în gândurile lui și care mă va privi de sus și cu neîncredere. Toate gândurile mi s-au risipit când ușa biroului Profesorului s-a deschis și am fost poftită înăuntru. L-am găsit pe Profesor la biroul lui și am fost impresionată de câtă eleganță inspira. Eleganță în vorbă, în gestică, în îmbrăcăminte. Mi-a pus multe întrebări, iar la toate răspunsurile mele, el își nota într-un carnet niște semne. Știu că i-am spus despre tehnicile pe care le învățasem în timpul pregătiri lucrării de licență, dar am insistat să spun că nu făcusem nici o electroforeză cu mâna mea. Profesorul mi-a răspuns: ”vei face multe electroforeze de acum încolo”. Pentru mine a fost o rază de speranță, adică un viitor care se deschidea… Într-adevăr, peste puțin timp am fost anunțată că pot veni la Institut pentru a începe lucrul. La 1 august 1994 am sosit la institut și la intrare am întâlnit-o pe Luminița Rădulescu, care fusese și ea primită în rândul IBPC-iștilor. Din păcate, eu și Luminița am fost ultimele cercetătoare angajate de Profesor…
După o perioadă de acomodare în institut, doamna dr. Maya Simionescu ne-a chemat

și ne-a repartizat în laboratorul doamnei dr. Ina Heltianu. Eu urma să lucrez cu doamna dr. Ina Heltianu, iar Luminița cu doamna dr. Felicia Antohe. Mai târziu am aflat că s-a dat cu banul, pentru că repartiția noastră între cele două șefe să fie total aleatorie. Nu știu dacă pentru mine a fost cap sau pajură, știu însă că doamna Ina mi-a arătat atât primii pași în lumea fascinantă a cercetării, dar mi-a fost și îndrumător în laborator pe toată perioada stagiului meu de doctorat. Și astfel, zece ani am lucrat împreună cu doamna Ina, alături de care am învățat despre rigurozitatea experimentelor, molipsindu-mă totodată cu entuziasmul și pasiunea pentru această meserie.

În 1999 am avut o altă experiență, participând alături de doamna Maya la realizarea aplicației pentru obținerea titlului de Centru de Excelență și totodată a unui grant de mobilitate acordat de Comunitatea Europeană prin Programul Cadru 5. Împreună cu doamna Maya am lucrat o lună de zile până seara târziu. A fost o experință importantă pentru mine, pentru că am realizat cu câtă seriozitate trebuie abordat un astfel de proiect. În plus, în toată acea perioadă am fost uimită cu câtă putere de muncă și dedicație doamna Maya se apleca asupra proiectului. Nu pot să uit că, în ciuda faptului că mulți alți cercetători de la alte institute renunțau pe parcurs, doamna Maya nu putea fi oprită din muncă și nimic nu a influențat negativ realizarea proiectului nostru. Înainte de termen am avut o noapte albă, iar în zorii zilei proiectul trebuia tipărit și trimis prin poștă. Bineînțeles că printerul și calculatorul de rețea s-au blocat. Împreună cu doamna Maya, bântuind prin institut, pe la ora 5 dimineața am reușit să deblocăm printerul și calculatorul și să facem și copiile necesare. Când s-a deschis poșta eram deja cu proiectul în mână, gata de expediat. În anul 2000, Institutul a fost ales ca Centru de Excelență al Comunității Europene, spre bucuria tuturor, dar parcă mai mare, a mea…

La începutul anului 2004 mi-am susținut teza de doctorat, iar în toamnă, împreună cu doamna Maya am început realizarea altei aplicații la Comunitatea Europeană. De această dată, am mai avut un ajutor, cel al Madălinei Fenyo. Pot spune că perioada pregătirii acestui proiect a fost una cu multă muncă, dar și cu momente pline de haz. Aplicația trebuia trimisă electronic, așa că deși nu mai aveam problema tipăririi, totuși înaintea termenului a fost din nou o noapte albă. Ca să nu treacă momentul aplicației fără peripeții, serverul de la Comunitatea Europeană s-a blocat, iar termenul de depunere a fost extins cu o zi sau două - perioadă binevenită, ca orice zi dinaintea unui examen. Proiectul - SERA - a fost unul de succes și majoritatea cercetătorilor din institut au putut beneficia de stagii de specializare în laboratoare din străinătate sau au participat la diferite întruniri științifice în perioada 2005-2008.

Și iată-ne în 2009, când institutul împlinește 30 de ani de existență, iar pentru mine... 15 ani de când îmi e a doua casă!

Dr. Anca Gafencu

***

De aici, din Canada, gândurile mă poartă deseori către Institutul de Biologie și Patologie Celulară (IBPC) din București care poartă azi numele fondatorului său, Profesorul Nicolae Simionescu.
IBPC „Nicolae Simionescu" din București este locul unde, ca proaspăt absolvent de facultate am avut șansa să descopar tainele biologiei celulare de la doi maeștri ai domeniului: Prof. Nicolae Simionescu și Prof. Maya Simionescu. Domnul Profesor, așa cum îl numeam noi pe Prof. Nicolae Simionescu, avea o forță de muncă extraordinară și plăcerea nedisimulată a savantului care trăiește din plin bucuria noilor descoperiri din domeniul său de cercetare. Institutul, o oază de știință și cercetare avansată în România anilor '80 și mai departe, este de asemenea locul unde atât eu, cât și alți colegi ne-am format ca cercetători. Dupa 14 ani petrecuți în IBPC „Nicolae Simionescu" am plecat spre Canada cu regretul de a părăsi țara și un loc de muncă care devenise a doua mea familie.

Acum la 30 de ani de al înființarea institutului doresc să trimit un gând bun tuturor colegilor de muncă și recunoștința mea Acad. Maya Simionescu care a continuat să conducă mai departe destinele și standardul înalt al institutului, după trecerea în neființă a Prof. Nicolae Simionescu.

Mirela Hașu
27 may 2009,
University of Ottawa Heart Institute, Ottawa, ON, Canada

***

Vă mulțumesc foarte mult pentru această experiență atât de bogată, cum a fost vizita în acest institut. A fost momentul cel mai semnificativ al scurtei mele vizite în România și voi fi onorat să mă întorc din nou aici. Și mai important este cu siguranță faptul că mulți oameni de știință din multe țări vor dori să muncească aici, deoarece un astfel de mediu nu poate decât să stimuleze performanțele științifice.

Claude Lenfant
Centrul Internațional Fogarty, Institutele Naționale de Sănătate
Bethesda, SUA,
Ianuarie 1981

***

Mi-am dat seama că nu este niciodată prea târziu să înveți, să te bucuri că iubești, să dai și să primești. Cele mai călduroase urări colegilor mei din România.

Sampath Parthasarathy
Universitatea California San Diego, SUA
16 mai 1985

Nicolae și Maya,
Vă mulțumesc pentru minunata ospitalitate în această săptămână. Va rămâne o săptămână foarte memorabilă în cariera mea științifică.
Felicitări pentru a zecea aniversare a institutului. În acești zece ani voi ați cîștigat o reputație mondială recunoscută pentru excelența în știință și reprezentați un model renumit pentru viitorii oameni de știință români.

Urările mele cele mai bune pentru viitor,

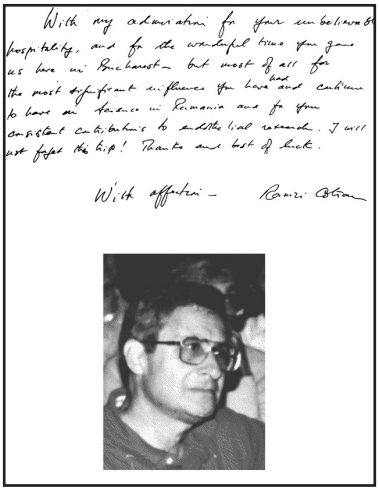
Bryan Brewer, Jr.
Directorul Diviziei de Boli Moleculare a Institutelor Naționale de Sănătate
Bethesda, SUA
1 septembrie 1989

***

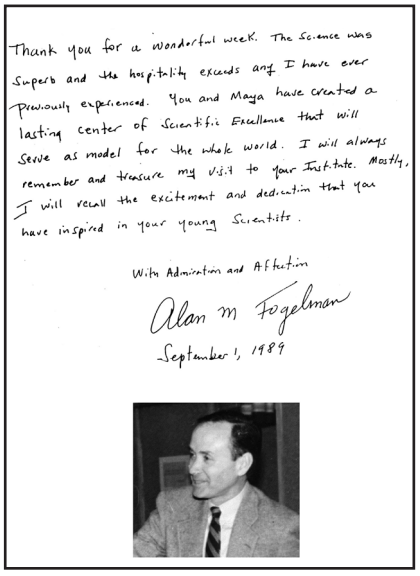
Cu admirația mea pentru incredibila voastră ospitalitate și pentru sejour-ul minunat pe care ni l-ați oferit aici în București, dar mai mult decît orice, pentru influența cea mai evidentă pe care voi ați avut-o și continuați s-o aveți asupra științei din România și pentru contribuțiile voastre consistente la cercetările asupra endoteliului. Nu voi uita această călătorie.

Vă mulțumesc și vă doresc cel mai mare succes.

Cu afecțiune,
Ramzi Cotran
Profesor și Chairman al Departamentului de Patologie al Universității Harvard Boston, MA, SUA , Președintele Societății Americane de Patologie
1 septembrie 1989


With my admiration for your incredible hospitality, and for the wonderful time you gave us here in Bucharest but most of all for the most significant influence you have and continue to have on science in Romania and for your consistent contributions to endothelial research. I will not forget the trip! Thanks and best of luck.

With affection – Ramzi Cotran


Thank you for a wonderful week. The Science was Superb and the hospitality exceeds any I have ever previously experienced. You and Maya have created a lasting center of Scientific Excellence that will serve as model for the whole world. I will always remember and treasure my visit to your Institute. Mostly, I will recall the excitement and dedication that you have inspired in your young Scientists.

With Admiration and Affection

Alan M Fogelman

September 1, 1989

Vă mulțumesc pentru această săptămână minunată. Știința a fost superbă, iar ospitalitatea depășește pe oricare am întâlnit-o pînă acum. Tu și cu Maya ați creat un centru durabil de excelență în știință care va servi drept model pentru întreaga lume. Îmi voi aminti și prețui pentru totdeauna vizita mea la institutul vostru. În mod special voi memora stimularea și dăruirea pe care ați inspirat-o tinerilor voștri cercetători.

Cu admirație și afecțiune,

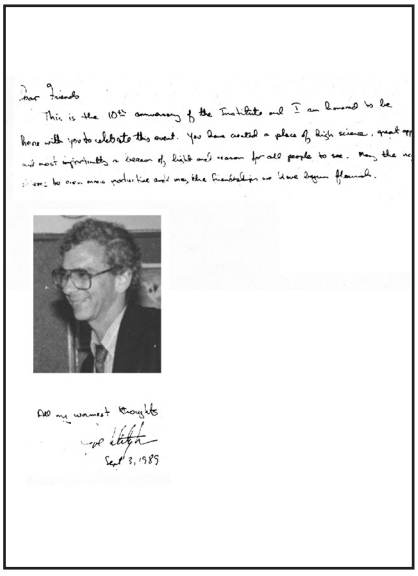
Alan M. Fogelman
Profesor și Director al Diviziei de Cardiologie
a Universității din Los Angeles, CA, SUA
1 septembrie 1989

***

Dragi prieteni ,
Aceasta este a X-a aniversare a institutului vostru și sunt onorat să fiu aici cu voi la celebrarea acestui eveniment. Voi ați creat aici un așezământ de știință de înaltă calitate, de mari oportunități și, mai presus de asta, o sursă de lumină și rațiune pentru toți oamenii. Fie ca următorii zece ani să fie și mai productivi, iar prietenia începută să înflorească.

Cu cele mai calde gânduri,

Joe Witzum
Profesor, Departamentul de Medicină Internă,
Universitatea California San Diego, SUA
3 septembrie 1989


Dear Friends

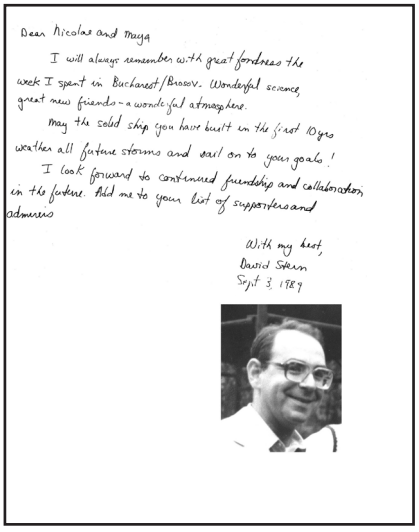
This is the 10th anniversary of the Institute and I am honored to be here with you to celebrate the event. You have created a place of high science, great opportunity, a beacon of light and reason for all people to see. May the next ten be even more productive and may the friendships we have begun flourish.

And my warmest thoughts

Sept 3, 1989

Dragă Nicolae și Maya,
Îmi voi aminti întotdeauna cu multă duioșie săptămâna pe care am petrecut-o în București/Brașov. Știință minunată, noi prieteni extraordinari – o atmosferă minunată. Fie ca solida corabie pe care ați construit-o în primii zece ani să înfrunte toate furtunile viitoare și să navigheze spre scopurile voastre!
Sper într-o continuă prietenie și colaborare în viitor. Adăugați-mă la lista voastră de suporteri și admiratori.

Cu cele mai bune urări,
David Stern
3 septembrie 1989


Dear Nicolae and Maya
I will always remember with great fondness the week I spent in Bucharest/Brasov. Wonderful science, great new friends - a wonderful atmosphere.
May the solid ship you have built in the first 10 yrs weather all future storms and sail on to your goals!
I look forward to continued friendship and collaboration in the future. Add me to your list of supporters and admirers
With my best,
David Stern
Sept 3, 1989

***

Pentru Maya și Nicolae,
Mulțumesc pentru această neașteptată și incredibilă experiență. Am venit fără să știu ce să mă aștept și îmi găsesc greu cuvintele să descriu ceea ce am găsit. Unicitatea acestui institut creat de voi constă în combinația între calitate și bucuria de a lucra. Am vizitat laboratoare din diferite părți ale lumii, dar niciodată până acum nu am avut privilegiul să întâlnesc atât de mulți oameni de știință de primă clasă, depunând atâta pasiune în munca lor. Acest institut este creația voastră. Vă felicit. Vă salut.

Michael Balls
Secretarul General al Organizației Europene de Biologie Celulară
Universitatea din Nottingham, Anglia
11 iunie 1982

***

Cu mare admirație pentru munca profesorilor Simionescu, pentru semnificația ei în medicină, pentru înțelegerea între oameni, pentru prestigiul țării lor, pentru pregătirea studenților și în beneficiul tuturor acelora care au o inimă în piept. Le doresc succes continuu în tot ceea ce întreprind.

Roger Kirek
Ambasador al Statelor Unite ale Americii
17 iunie 1987

Vizitarea acestui institut de cercetări remarcabil a fost o ocazie cu totul deosebită. Nu poți să nu fii impresionat de spiritul efortului scolastic care domnește peste tot, ca și de devotamentul și pasiunea omniprezente.
Sunt mai convins ca niciodată că natura muncii dumneavoastră și rezultatele ei vor contribui cu siguranță la înțelegerea atât a (pato)fiziologiei, cât și a viitoarei ere terapeutice.

Erik Tomlinson
Fundatia Ciba-Geigy, Horsham, Departamentul de Farmacie
Universitatea din Nottingham, Anglia
21 sept. 1987

***

Nu găsesc cuvinte să îi spun Doamnei Simionescu și colaboratorilor săi cât de mult sunt impresionat de Institutul care poartă numele gloriosului său fondator. Este remarcabil faptul că, în ciuda numeroaselor obstacole, aveți siguranța unei calități a cercetării recunoscute de Comunitatea Europeană și este cu totul meritoriu faptul că sunteți Centru de Excelență. Sunt convins că vom stabili o colaborare foarte bogată și mulțumesc Prof. Montreuil, care este la originea acestei apropieri.

Prof. Jean-Charles Fruchart
Institutul Pasteur și Universitatea din Lille, Franța
1 martie 2002

***

AMINTIRI DESPRE CEI DOI SIMIONESCU

Sunt bucuros să am ocazia de a spune câteva lucruri despre Maya și Nicolae Simionescu, pe care i-am cunoscut la Yale la sfârșitul anilor '70 și începutul anilor '80, când eram conferențiar la Secția de Biologie Celulară de la Yale. La acea vreme, ei soseau la Yale anual și susțineau cursul de Biologie Celulară, piatra de încercare a educației la Facultatea de Medicină, curs organizat și condus de George Palade și de Marilyn Farquhar. Împreună cu Maya și Nicolae am avut responsabilitatea predării histologiei. Pentru mine personal, lucrul cu cei doi Simionescu a fost o experiență remarcabilă. Ei prezentau un impresionant exemplu de dedicatie, entuziasm și competență. Totul trebuia preparat și planificat dinainte, în cel mai bun mod posibil. Nu lăsau nimic la voia întâmplării și a improvizațiilor. Erau foarte exigenți asupra calității cursurilor pe care le predau și acest standard l-au transmis și colegilor mai tineri, cum eram eu. Iar studentii le apreciau cursurile cu cele mai înalte calificative. Astăzi, când întâlnesc doctori sau cercetători care au fost educați la Yale, descopăr ca și ei au amintiri

minunate despre Maya și Nicolae.
Îmi făcea plăcere să-i văd venind în fiecare toamnă și le simțeam lipsa la sfârșitul cursului.Aduceau cu ei o perspectivă revigorantă în atmosfera unei instituții americane privilegiate. Era evident că cei doi Simionescu își puseseră toata energia (și mai mult decât atât) în crearea noului Institut de la București. Dedicarea lor unei „cauze", aceea de a creea un centru științific de excelență în țara proprie a fost extraordinară. De fapt, ei au fost cei care m-au inspirat la întoarcerea mea în Italia, după o prima perioadă în SUA. Am fost fericit să fiu multi ani în contact cu cei doi Simionescu, a fost o bucurie totdeauna să ne revedem și să aflu progresele lor științifice și despre Institutul lor. Când viața m-a adus înapoi în America la sfârșitul anilor '80, m-am bucurat din nou de susținerea lor. Nu aș fi azi unde sunt dacă nu ar fi fost ei.
Este cu adevărat remarcabil ceea ce au înfăptuit Maya și Nicolae. Cu rezultatele cercetărilor lor au contribuit la conturarea formei actuale a biologie celulare a vasculaturii. Totodată, ei au contribuit la conturarea științei în țara lor și au creat un Institut excepțional în Europa de Est.

Pietro De Camilli, M.D.
Eugene Higgins Professor, Department of Cell Biology
Howard Hughes Medical Institute, Yale University School of Medicine
24 mai 2004

***

IBPC LA VÂRSTA ADUCERILOR AMINTE

Tristețea se amestecă cu bucuria acum, când ne pregătim să sărbătorim Institutul lui Nicolae Simionescu - în absența lui. Ce ironie a sorții a făcut ca el să fie doborat tocmai de maladia care a constituit subiectul de cercetare al Institutului. Noi ne simțim extrem de privilegiați de a avea împreună cu Nicolae și Maya o întreagă comoară de amintiri, unele chiar de acum 28 de ani, din etapa pe care am putea-o numi stadiul embrionar al Institutului.
În 1975 am întâlnit doi biologi celulari eminenți, cunoscuți ca „Cei doi Simionescu" (și, uneori, inevitabil, „SimoNIESCUs"). Ei au fost aleși personal de Dr. George Palade în București; în laboratorul renumit al Dr. Palade, au devenit pasionați de studiul endoteliului. La acea vreme, endoteliul era peste tot (ceea ce așa și este) și fiecare cercetător in acest domeniu și-a dat seama că, dacă vrei să știi noutățile asupra endoteliului, trebuie să vii in contact fie cu unul, fie cu ambii cercetători români. Ne-a făcut cunoștință cu ei Dr. Palade, iar prietenia noastră a fost instantanee (de fapt, Nicolae ne-a fost martor la nuntă). În cercetare, ei aveau aceleași standarde riguroase ca Dr. Palade; aveau același accent distinct „RRRomanian", lăsând impresia că, pentru a fi la vârful biologiei endoteliului, trebuie să ai o pronunție adecvată a unor cuvinte ca „RRRibosomes" și „TRRRanscytosis" (și aceasta era adevărat).

Cei doi Simionescu au arătat clar că ei nu erau dezertori din România, ci dimpotrivă, ei așteptau să se construiască noul lor Institut conform cu planurile pe care le trasasera cu atenție și grijă. Noi lucram în Worcester, la Universitatea din Massachusetts, Facultatea de Medicină. Distanța dintre New Haven și Worcester era prea mare doar pentru a lua masa împreună, așa că ne întâlneam la jumătatea drumului. Dacă aveam timp suficient, petreceam un sfârșit de săptămână la Haven sau la Worcester. Oriunde ne întâlneam, discutam în detaliu experimentele noastre; nicicând nu ne-am gândit că eram, în fapt, competitori.

Nicolae și Maya desenau planurile viitorului Institut pe servețelele de hârtie de la restaurant. Părea ca un vis de cercetător: biologi desenând cuibul lor științific, un cuib care include biologie și patologie. După câte cunoaștem noi, această caracteristică a IBPC era unică la acel moment; cele două litere reunite - BP - reprezintă un plan de lucru, dar și o filosofie a naturii: patologia nu este o știință per se, ci o extindere a biologiei normale. Virchow, fondatorul patologiei moderne, exprima acest concept în 1858: „Patologia este fiziologia cu obstacole" („Physiologic met Hindemissen"). Rezultă că nu poți înțelege complet „normalul", fără starea anormală, și invers.

Deschiderea oficială a IBPC a fost în 1979. O veste bună, dar viața a devenit și mai stresantă pentru soții Simionescu; în baza unui contract oficial, ei urmau să vină în fiecare an pentru 3 luni în SUA, în scopul unor cercetări și activități didactice avansate. Dar dacă Guvernul le refuză viza de ieșire? Ce s-ar fi întâmplat cu angajamentele de la Universitățile Yale, Columbia, Rockefeller sau din alte locuri, unde Maya și Nicolae erau implicați în activitatea didactică? Aceasta catastrofă a fost cât-pe-ce sa se întample de mai multe ori, iar stresul ei a fost greu de suportat chiar și de către noi.

În ultimii ani am avut de două ori plăcerea și onoarea de a vizita IBPC. Primirea organizată de soții Simionescu pentru musafiri era așa de extraordinară, încât aspectele umane, ca și rezultatele științifice au rămas de neuitat. Unul din noi (G.M.) a fost impresionat de numele frumoase ale doamnelor: Doina, de exemplu, sună în urechea unui italian ca două note muzicale ale unui instrument străvechi.

Cu toate lipsurile și dificultățile vremurilor, Nicolae și Maya reușeau să organizeze pentru vizitatori meniuri românești de neuitat. O altă experiență miraculoasă, de data aceasta pentru urechea muzicală, au fost sunetele unui violonist, un domn mai în vârstă, care ne-a încântat cu melodille sale. În timp ce cânta la vioară, se apropia blând de urechea noastră și eram martorii unui sunet pur, de muzică pură, aproape fără nici un zgomot mecanic interferent. A fost extraordinar, iar pentru un violonist amator este aproape imposibil de realizat așa ceva.

Când am vizitat laboratoarele, am fost uluiți de eforturile echipei de cercetare în numele „economiei". În ultimul moment, guvernul decisese să plătească salariile, dar nu și materialele de laborator. Nimic nu era de unică folosință; nici chiar soluțiile. Când minusculele preparate ce urmau a fi examinate prin microscopie electronică erau fixate în osmium, acest reactiv era re-extras și refolosit. Judecând după rezultate, această metodă - disperată, după cum ni s-a părut nouă - a dat rezultate. În anii din urmă am văzut exemple minunate ale „economiei" în microscopie electronică

folosind fragmente de valve aortice de la animale cu hipercolesterolemie.
Micrografiile electronice ale „liposomilor" peretelui vascular, situați sub un endoteliu intact sunt până astăzi cea mai bună reprezentare a leziunilor aterosclerotice incipiente vizibile prin microscopie electronică.
Noi am fost și martorii timpurilor grele trăite sub dictatură: greutățile zilnice sau chiar ale fiecărei ore erau așa de departe de tot ce este normal și uman, încât azi par a fi de necrezut. Nicolae era intransigent, și la fel si Maya, patenera sa esențiala în știință și în viață. Umorul nestăvilit al lui Nicolae l-a ajutat poate, dar riscurile pe care și le-a asumat erau zilnice. Maya și Nicolae au refuzat rațiile suplimentare oferite prietenilor regimului. Ca Director al Institutului, Nicolae era obligat să afișeze portretul dictatorului în biroul său. El l-a atârnat undeva afară și-l arata vizitatorilor spunând: „Wrong Nicolae".
Pentru cercetătorii noilor generații care lucrează liniștiți la mesele de laborator este imposibil, poate, să-și imagineze cum era să efectuezi experimente la aceleași mese, în aceleași laboratoare, sub un regim dictatorial. O criză se putea produce în orice moment. Nicolae trebuia să fie permanent pregătit să aplaneze orice măsură care venea de la oficialități. De exemplu, într-o bună zi a aflat că Institutul va fi dărâmat imediat, deoarece interfera cu priveliștea viitoare de la ferestrele Palatului Poporului. Încearcă să faci un experiment, când o astfel de perspectivă plutește în aer!
Poate este normal să uităm acele vremuri - dar nu trebuie să uităm niciodată curajul celor care au ținut făclia pe drumul drept și corect în timp de furtună. Acest tip de curaj, mergând până la uitarea de sine, se numeste eroism.
Anul 1995 a adus o lovitură cruntă: Nicolae a plecat brusc dintre noi. Maya a fost de admirat, ca de obicei. În stilul tipic Simionescu, ea a continuat să lucreze cât doi, cu energia care trebuie să-i fi motivat pe înaintașii lor, Dacii.
Suntem mândri de a fi prietenii ei și ai Institutului de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" - un centru de excelență pentru știință si pentru umanitate.

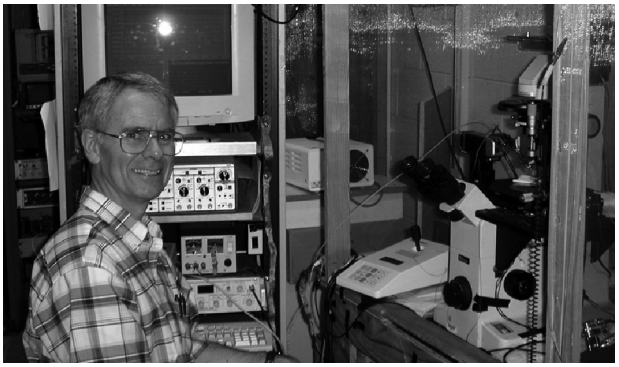
Isabelle Joris-Majno și Guido Majno
University of Massachusetts
2004

***

AMINTIRI DESPRE INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ ȘI DESPRE FONDATORII SĂI

Fondatorii IBPC, Nicolae și Maya Simionescu mi-au fost colegi, prieteni apropiați și, în multe privințe, cel de-al doilea rând de părinți în cea mai mare parte a carierei mele științifice. Eram absolvent și studiam cu George Palade și Jim Jamieson la Universitatea Rockefeller, când l-am cunoscut pe Nicolae și apoi pe Maya, care începuseră acolo studiile asupra structurii fine și permeabilității microvasculaturii. În

anii care au urmat am participat împreună la naşterea biologiei celulare moderne. În timp ce eu eram interesat de explorarea zonei distale din calea de secreţie în celule exocrine, am fost martorul explorării sistematice a permeabilităţii capilarelor în stilul Simionescu, şi la definirea variatelor forme ale transcitozei care sunt astăzi recunoscute ca proprietăţi ale endoteliului. La acea vreme, Rockefeller era paradisul nostru intelectual, un loc de refugiu într-un oraş tumultos, un loc unde eram uniţi prin dragostea pentru biologia celulară şi eram feriţi de orice alte lucruri exterioare care ne-ar fi distras atenţia. În multe privinţe cred că acest mediu a servit ca model pentru ceea ce a creeat Nicolae şi Maya la IBPC în Bucureşti.



În 1973, Nicolae, Maya şi cu mine ne-am „transcitat" împreună din New York la New Haven. Mutarea la Facultatea de Medicină Yale a fost importantă pentru IBPC din cel putin două privinţe: prima, a marcat începutul perioadei când „discipolii" Simionescu au fost trimişi la laboratoare internaţionale, în scopul de a forma conducători de grupuri de cercetare pentru viitorul Institut; a două, a fost locul în care cei doi Simionescu au început cea de-a doua carieră, ca arhitecţi ai activităţii fizice din IBPC. Îmi amintesc creionarea viitorului Institut de către echipa ştiinţifică de renume a celor doi Simionescu, alegerea înţeleaptă a direcţiilor ştiinţifice, discuţiile periodice cu George Palade; pentru mândrii părinţi, procesul de naştere al IBPC a semănat cu nouă ani de eforturi... (în loc de o gestaţie de... nouă luni). Interacţia mea cu cei doi Simionescu la Yale a avut şi o conotaţie personală importantă, deoarece m-am întors în 1978 în calitate de cadru didactic de Biologie Celulară, iar Nicolae a fost mentorul meu în primul an de predare la studenţii medicinişti. Îmi sunt vii în minte până azi lucrurile pe care le-am învăţat sub conducerea sa – descrierea logică şi ierarhică a organizării secţiunilor histologice, discutarea funcţiei fiziologice în contextul structurii şi rolul acestui eşafodaj pentru înţelegerea patologiei ţesuturilor. Sunt sigur că mulţi dintre dumneavoastră înţeleg ce vreau să spun! Şi azi continui să-i fiu recunoscător lui Nicolae care a menţinut standardul meu educaţional la cel mai înalt nivel. Şi tot acum, la împlinirea a 25 de ani de profesorat la Facultatea de Medicină, continui să folosesc cu mândrie bogatul set de ilustraţii splendide din capitolul celor doi Simionescu din Manualul clasic de Histologie editat de Weiss şi Greep.

Deşi încă nu am vizitat IBPC, experienţa mea cu Nicolae şi Maya m-a făcut să apreciez în mod deosebit modul în care poţi trăi la un nivel ştiinţific ridicat şi în care poţi

aduce contributii ştiinţifice valoroase. IBPC, o temelie ştiinţifică modernă dedicată înţelegerii proceselor biologiei celulare şi a celor patologice este astăzi, după 25 de ani, Centru de Excelenţă al Comunităţii Europene, fapt cu adevărat remarcabil. Acest Institut este o moştenire concretă, rezultat al combinării viselor, viziunilor, descoperirilor, creativităţii şi perseverenţei. Este un model viu pentru fiecare din noi. Închei cu urarea de felicitări din inimă şi urez IBPC inspiraţie şi succese şi în următorii 25 de ani!

J. David Castle
Profesor de Biologie Celulară
Director al Programului de Biologie Celulară şi de Biologie a Dezvoltării,
Universitatea din Virginia, SUA
2004

***

EVOCAREA UNEI PERSONALITĂŢI CREATOARE ÎN ŞTIINŢELE BIO-MEDICALE: PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU

Cu emoţie scriu aceste rânduri evocatoare, dăruite şi nu formale. Figura lui Nicolae Simionescu induce o puternică personalitate, răpită aşa de devreme din comunitatea ştiinţifică. Un creator de adevăr ştiinţific, un creator de instituţii, un ideal pentru tineri care vor aspira să ajungă acolo unde a ajuns el. Câte aş putea spune! Sunt emoţionat de ultimele lui cuvinte pe care le-am auzit la Academia Română după ce a prezidat şedinţa de intrare a unui coleg care şi-a rostit cuvântul de recepţie. L-am oprit şi i-am spus: „De ce te oboseşti aşa de mult? Trebuia altcineva să vorbească!" Nu e cazul să explic de ce! A răspuns: „V-am urmat exemplul pentru că sunteţi pentru mine unul din maeştrii mei." Acestea au fost ultimele cuvinte. M-a mişcat profund şi acum evocându-l nu o fac pentru mine, o fac pentru el, care nu şi-a renegat maeştrii. Ne-a arătat că nimeni nu vine în ştiinţă fără o formaţie istorică.
A vrut să facă şi în Academia Română tot ce trebuia. S-a devotat şi în această instituţie, să-i confere alt orizont ştiinţific, a elaborat planul grant-urilor competitive, contracte de cercetare, realizate prin respectarea libertăţii creatoare.
Ce exemplară a fost cunoaşterea noastră când a venit prima oară lângă mine! Eram atunci directorul Institutului de Endocrinologie. Apare în faţa mea, neaşteptat - un tânăr. Dar ce înfăţişare avea! Privirea lui, o văd halucinant în această evocare. „Vă rog să mă primiţi să lucrez în institutul ce-l conduceţi." „Dar de ce?" l-am întrebat. „Ştiu că eşti conferenţiar de anatomie la facultate, şi solicitat de cei mai mari chirurgi să devii chirurg" (a fost colaboratorul lui Juvara). Putea să fie un mare chirurg, un distins anatomist şi profesor. Renunţă la aceste posibilităţi şi vine în faţa mea. L-am întrebat: „Ce vrei şi de ce?" „Vreau să lucrez în ştiinţă." Adică în această nobilă preocupare a

omului care caută să pătrundă tainele Universului. Pentru că noi facem parte dintr-un Univers cu misterele lui. Niciunul dintre ele nu se poate explica, de ce este sau cum este. Suntem! În acel tânăr, care a apărut în fața mea, am simțit patosul lui, acea forță interioară căreia nu-i rezistă nimic. Renunță la două posibilități de afirmare din toate punctele de vedere și vine într-o instituție în care i se oferă două camere modeste la etajul întâi la Biobază. Și ce? Un microscop optic modest, un microtom și câteva substanțe colorante, așa cum se găseau atunci. Le-a perfecționat, a schimbat totul. Ce tensiune interioară, ce aspirație spre cunoaștere! Știința ne permite o reflectare mai reală a tot ceea ce vedem căutând explicația fenomenelor. A demonstrat-o din plin.

Nicolae Simionescu nu a semnat niciodată condica, a fost un colaborator fără program birocratic. Atunci când începea o cercetare, dacă trebuia să stea noaptea, rămânea și dormea în laborator până la terminare. Într-o zi i-am spus: „Prin acest laborator au trecut mulți și nu au descoperit ce se poate vedea". Într-adevăr, în cancerul glandei tiroide, pe lângă care trecuseră alții, a reușit să vadă cancerul medular. Se știe că tiroida are două varietăți de celule: celulele C și celulele foliculare. Cancerul banal, cunoscut, este cel folicular, dar acela din celulele C este cancerul medular. „Nu se poate, i-am spus, să nu fie printre zecile de cazuri operate". L-a găsit! Acei ochi pătrunzători și mintea care se ascundea îndărătul lor, cât a pătruns în ceea ce alții nu au văzut! A fost un descoperitor; el a adunat după aceea cazurile de biopsie ale cancerului tiroidian, care se operau în institut și i-am propus să scriem împreună o sinteză. Nu trebuiau să rămână numai în comunicări. „Sinteza rămâne pentru că reflectă gândirea asupra faptelor pe care le prezinți". Am semnat împreună propunerea la Editura Academiei pentru „Formele anatomo-clinice și fizio-patologice ale cancerului tiroidian". S-a devotat problemei cu aceeași stăruință și înțelegere afectivă. Era sensibil în procesul cunoașterii. Este explicabil de ce am comunicat cu el în diferite împrejurări. Este de fapt un factor condițional al cunoașterii. A luat de la mine, dar și eu am primit de la el. Acest tonus misterios pe care fiecare din noi poate să-l aducă, dacă e dăruit. Am refuzat în final ca lucrarea să fie semnată împreună, pentru că eu nu aveam ce căuta, când totul era el. Așa de bine era elaborată și originală. Descifrase peste zece forme anatomo-clinice și fiziopatologice pe care nimeni nu le-a văzut în literatură. Ce căutam eu acolo? Să parazitez gândirea și opera lui? Nu! Și așa a apărut „Histogeneza Cancerului Tiroidian", tradusă apoi în engleză și publicată la cererea a două edituri din Anglia și SUA (W. Heineman Medical Books Ltd., London Grune și Stratton, New York). Contribuția lui, în Institutul de Endocrinologie a fost marcantă, cu trăsături originale. N-a fost repetitor; a gândit în nou. În condițiile extrem de simple, pe care i le-am oferit atunci, a organizat evidența lucrărilor și sistematizarea lor. Laboratorul era impresionant prin această ordine care reflecta personalitatea lui.

Am mărturisit doar unele aspecte din comuniunea cu Nicolae Simionescu; ceea ce este caracteristic, instructiv și exemplar pentru personalitatea acestui mare învățat care a dispărut așa de timpuriu.

La prima vizită a Profesorului G. E. Palade în Institutul de Endocrinologie, nu mi-a cerut decât să-l vadă pe Simionescu. Îl cunoștea de la catedra de Anatomie. După vizita de

câteva ore, Prof. G. E. Palade mi-a spus: "Luptă-te pentru el" (era greu atunci să pleci în străinătate, trebuia să-ţi iei răspundere ş.a.m.d.- în perioada comunistă). „Poate mai mult decât îi oferi aici." Şi într-adevăr a demonstrat cu prisosinţă aceste posibilităţi.
A început astfel o nouă perioadă fecundă în activitatea lui ştiinţifică şi profesională, reuşind în colaborare (începută încă din Institutul de Endocrinologie) cu distinsa şi dotata sa soţie să-şi perfecţioneze metodele de cercetare, să-şi însuşească cu pasiune metodologia contemporană, impunându-se prin rezultatele obţinute în institutele de cercetare şi învăţământ din SUA. I-a fost acordat gradul de profesor la două universităţi americane şi s-a impus internaţional la congrese şi invitaţii prin capacitatea de reprezentare a unei activităţi devotate.
S-a reîntors în ţară după o îndelungată absenţă, cu hotărârea de a construi un institut consacrat biologiei celulare. Pe un loc viran, cu discreţie, aproape în secret, a construit împreună cu Maya Simionescu Institutul de Biologie şi Patologie Celulară. Este opera lui. Asemenea marilor constructori ai ştiinţei medicale româneşti, a introdus Biologia şi Patologia Celulară în ţara noastră, a lăsat poporului nostru o instituţie în care se poate dezvolta ştiinţa, se poate învăţa, se poate găsi noul şi arăta că noi putem fi creatori. El a demonstrat din plin această capacitate. Nu trebuie să-l uităm! Cei care uită, sunt uitaţi la rândul lor.

Academician Ştefan Milcu

***

Institutul de Biologie si Patologie Celulară este asemănător unei opere de artă, prin concepţia ce a stat la baza construcţiei sale, prin distribuţia spaţiilor şi prin armonia legăturilor funcţionale. Nu este surprinzător că a fost realizat astfel de către doi ilustri elevi ai şcolii româneşti de biologie şi medicină, care au reuşit să se impună prin opera lor în lumea ştiinţifică contemporană şi să ajungă la poziţii de prestigiu. Elevilor şi prietenilor mei, Dr. Nicolae şi Maya Simionescu, le datorăm admiraţia şi recunoştinţa pentru tot ce au făcut şi pentru tot ce vor dărui ştiinţei în anii viitori, ce-i dorim să fie îndelungaţi şi rodnici.
Vă urez o deplină realizare în tot ce întreprindeţi!

Academician Ştefan Milcu
5 mai 1980

***

Îl cunosc pe Dr. Simionescu din 1953 când, în dorinţa mea de a avea colaboratori tineri şi dornici de a se instrui, a fost numit în Clinica de Chirurgie pe care o conduceam. Am lucrat împreună 4 ani, tânărul Dr. Simionescu distingându-se prin întreaga sa activitate, ca un element ieşit din comun, poate prea bun pentru a rămâne doar un „simplu

chirurg". Așa se face, probabil, că a a trecut în cercetarea științifică fundamentală în care i-am urmărit activitatea și care a culminat prin specializarea sa în Biologie Celulară. Institutul pe care îl conduce, conceput personal atât din punct de vedere organizatoric, cât și functional, precum și calitatea cercetărilor sale deosebite, marchează din plin calitățile sale deosebite pe care le-am constatat cu ocazia colaborării noastre. A știut să-și aleagă colaboratorii, a știut să-i dirijeze creând o unitate de cercetare care reprezintă un unicat în țara noastră. Vreau să subliniez, de asemenea, simtul său patriotic, în sensul creării în țara noastră a unei școli de cercetare cu răsunet internațional.
Soția sa, Maya Simionescu, a fost și este o colaboratoare excepțională care l-a secondat permanent în întreaga sa activitate. Îi felicit pe soții Simionescu și le doresc mari succese în activitatea lor.

Cu veche și constantă prietenie,
Prof. Ion Juvara
August 1983

***

CUVÂNT LA A 20-A ANIVERSARE A IBPC

Înființarea Institutului de Biologie și Patologie Celulară, în anul 1979, a constituit atunci, un fenomen de excepție, o aventură aproape incredibilă. A reuși implantarea unei instituții științifice de vârf, de tip occidental, era ceva efectiv de domeniul fantasticului. Și, totuși, acest Institut s-a născut, a funcționat și am văzut cum s-a dezvoltat ca un centru de excelență al științei românești, nu doar din 1999, când a primit această etichetă, ci încă de la început.
Sigur că elementul conjunctural al sprijinului moral primit din partea Profesorului George Palade a fost esențial, dar factorii decisivi au fost existența, calitățile, strădaniile și abnegația părinților acestui Institut, soții Nicolae și Maya Simionescu. Valoarea lor ca personalități științifice, susținută de renumele dobândit prin opera științifică realizată au fost ceea ce a permis dobândirea încrederii și de partea cealaltă a Atlanticului, unde funcționa în continuare un sistem de apreciere realistă, exigentă, aș zice chiar dură a valorilor, și faptul că au trecut cu bine acest examen și apoi, au reușit să-l treacă în continuare, cu întreaga echipă, dupa înființarea Institutului, acum 20 de ani. Grant-urile obținute au constituit oxigenul pentru funcționarea în continuare a noului Institut. Dar, pentru ca materialele, reactivii să ajungă în strada Hașdeu, a fost nevoie de multe strădanii, de multe subterfugii și de eforturi disproporționat de mari.
Echipa a crescut și s-a maturizat. A trecut de bună-seamă printr-un proces de selecție naturală. Au rămas dintre cei mai buni. Este o adevarată echipă, foarte unită în jurul căpitanului navei și a secundului său și, pentru toți, motivația trece prin inimă și prin neuronii de elită, și mai puțin prin pusculiță. Curând dupa Institut, s-a creat Societatea

Națională de Biologie Celulară, lărgind sfera de acțiune a Institutului.
După decembrie '89, când zidul Berlinului dispăruse, îl folosesc ca simbol, și totul părea să se fi schimbat. Profesorul Nicolae Simionescu și-a dirijat firesc activitatea și pe un plan mult mai larg, întreprinzând o adevarată cruciadă pentru instaurarea unui sistem coerent și corect de judecare a valorilor în cercetarea românească. A fost uneori aproape mai greu decat înființarea Institutului. Nu mai era vorba numai de implantarea unui grefon sănătos și viguros într-un organism bolnav, era vorba de încercarea de a vindeca însuși organismul. Și s-a dedicat acestui ideal cu aceeași obstinație, cu același optimism și cu binecunoscuta sa bună-credință. A fost și de data aceasta o ocazie de a face uz de cea mai rară și cea mai prețioasă formă de curaj: curajul intelectual. Și roadele au început să se arate, chiar dacă mai timide și mai lente, la început, decât le-ar fi dorit impetuozitatea lui.
Astăzi, D-na Maya Simionescu ține nu numai cârma Institutului și a Societății Naționale de Biologie Celulară, dar se îngrijește și de continuarea a ceea ce începuseră împreună pentru vindecarea mentalităților în știința românească. Și îi dorim din toată inima succes pe toate fronturile, atât domniei sale, cât și tuturor membrilor echipei, întregului Institut pe care îl aniversăm astăzi.

Profesor Dr. Andrei Combiescu
Director al Institutului de Microbiologie și Imunologie „ I. Cantacuzino"
1999

***

CUVÂNT LA A 20-A ANIVERSARE A IBPC

În cei 20 de ani de când pionierii și conducătorii Institutului, Profesorul Nicolae Simionescu și Profesor Maya Simionescu, au pus bazele Institutului, ei și Institutul lor au intrat în istoria științei, a cardiologiei și a învățământului din țara noastră. Permiteti-mi să explic de ce Institutul a fost și este un exemplu pentru noi toți, foruri academice, științifice și universitare.
În primul rând, au creat pentru cercetarea medicală și pentru cercetarea biologică standarde care au devenit de referință pentru țara noastră. Aceste standarde sunt standardele medicinei și biologiei din Europa și Statele Unite, standarde către care trebuie să tindă cercetarea științifică de pretutindeni. Metodologia lucrărilor Institutului, planificarea cercetării, modul de prezentare în reuniunile științifice, publicațiile din revistele de specialitate, modul de constituire a echipelor de cercetare, cel puțin toate acestea au plasat Institutul într-o poziție de referință pentru medicina noastră și pentru cercetarea științifică de la noi.
În al doilea rând, aș vrea să subliniez că, de la început, conducătorii Institutului și cercetătorii din Institut s-au concentrat pe câteva probleme de biologie și patologie cardiovasculară, care abia după 15-20 de ani au devenit fundamentale și prioritare

în cardiologie. De la cardiologia clinică în perioada '60-'90, s-a dezvoltat cardiologia de explorare și cea intervențională. În ultimii 5 ani, cardiologia a trecut în era cardiologiei celulare și moleculare și aceste domenii, altădată rezervate cercetătorului hiperspecializat, au devenit astăzi domenii obligatorii pentru cardiologi.
Știința înseamnă, desigur, nu numai cercetare, înseamnă și anticipare. Și conducătorii Institutului au dovedit un spirit excepțional de anticipație pentru cardiologie, pentru care trebuie să le fim recunoscători. Fiziologia și patologia endoteliului vascular, care reprezenta în urmă cu 15 ani, un domeniu al inițiaților, a constituit de-a lungul a 20 de ani, domeniul prioritar de cercetare al Institutului.
Astăzi, patologia endoteliului vascular reprezintă un element central în cardiologia modernă, în aterosclerază, în hipertensiunea arterială, în boala cardiacă ischemică. Dar, toate acestea nu ar fi fost posibile fără dăruirea totală, înalta responsabilitate științifică, calitățile de cercetător, educator și de conducător ale Profesorului Nicolae Simionescu și a Profesorului Maya Simionescu. Destinul nedrept a făcut ca Profesorul Nicolae Simionescu să nu fie prezent astăzi, dar spiritul său a rămas în Institut.
Închei prin a spune că, oricât de grele ar fi situațiile istorice, când există speranță și când există inteligență, se poate realiza ceva. Institutul și Dumneavoastră ați dovedit-o cu prisosință.

Prof. Dr. Leonida Gherasim
Spitalul Clinic Universitar - Bucuresti
1999

***

Stimată Doamnă Academician Maya Simionescu,
Onorată Asistență,

Filiala București a Societății Naționale de Biologie Celulară cinstește memoria Profesorului Nicolae Simionescu, strălucit om de știință și prestigios întemeietor de școală. Dispariția lui fulgerătoare a însemnat o pierdere ireparabilă pentru știința românească și a îndurererat profund pe toți cei care l-au cunoscut și iubit. Prin opera sa, prin ceea ce a sădit în mințile și inimile celor care i-au fost colaboratori și discipoli el rămâne și va fi mereu prezent în mijlocul lor.
Natura a fost darnică cu Profesorul Simionescu. L-a înzestrat cu o inteligență creatoare, cu o putere de muncă fără seamăn, cu o generozitate rar întâlnită. Analiza operei sale științifice nu poate fi făcută decât de specialiști, de aceea ne vom mărgini la schițarea principalelor ei momente.
Deși consemnată în peste 500 lucrări, dintre care mai mult de jumătate apărute în publicații de peste hotare, opera științifică a Profesorului Simionescu a avut la bază o concepție unitară, aceea a relației dintre structură și funcție în stare normală și patologică. Găsim aici ideea lui Goethe: „Forma nu este decât o funcție care s-a

consolidat", idee implicată în formula lui Francisc Rainer: „Anatomia este știința formei vii". În decursul celor 4 decenii în care s-au desfășurat cercetările Profesorului Simionescu au reflectat progresele uimitoare ale tehnicilor de investigație, ca și evoluția accelerată a concepțiilor teoretice ce a avut loc în biologie în ultimile etape ale acestui mileniu.

Începutul cercetărilor Profesorului Simionescu e reprezentat de studii de morfologie vasculară și angioarhitectonie publicate în perioada 1956-1960. În paralel și apoi în continuare s-au succedat cercetări de morfologie și morfopatologie endocrină. Un moment important îl reprezintă colaborarea Prof. Simionescu la cercetările Acad. Șt. Milcu asupra patologiei topochimice și ultrastructurale a gușii familiale. O altă importantă cercetare în colaborare cu Prof. Milcu privește glanda pineală și căile hemocrine și interstițiocrine ale acesteia.

O cuprinzătoare monografie publicată de o editură din Londra și NewYork sintetizează contribuția Prof. Simionescu la histogeneza cancerului tiroidian.

În perioada 1970-1979, Prof. Simionescu își desfășoară activitatea la Universitatea Yale și Rockefeller din Statele Unite. Aici, împreună cu George Palade își începe cercetările privind biologia celulei endoteliale. Acestui domeniu Prof. Simionescu îi va rămâne credincios pentru toată durata vieții sale și îi va consacra întreaga sa putere de muncă și creație. În acest domeniu el a adus strălucite contribuții care au intrat în patrimoniul internațional al biologiei și patologiei celulare. Cu tehnici remarcabile a demonstrat existența unor microdomenii diferențiate pe suprafața celulelor endoteliale, a descris particularitățile unor receptori și a urmărit transportul transendotelial al macromoleculelor.

Profesorul Simionescu a fost întotdeauna animat de dorința de a întemeia în România un centru în care studenții și doctoranzii să fie antrenați în cercetarea biomedicală. Din această idee, din acest vis a luat ființă Institutul de biologie și Patologie Celulară. În construcția, dotarea și organizarea acestui Institut a investit imensa sa putere de muncă și tot atâta experiență și creativitate. Gândit de el până în detaliile construcției și funcționalității, Institutul reflectă spiritul său ordonat și metodic. S-a confirmat încă o dată vechiul adagiu „mens agitat molem", spiritul însuflețește materia.

Echipa de cercetători formată de profesorii Nicolae și Maya Simionescu a desfășurat o cercetare de calitate ale cărei rezultate sunt recunoscute și larg citate în literatura internațională. Se realizează în continuare un program de cercetare cu laboratoare din Statele Unite. Institutul a fost reprezentat în foruri internaționale de profesorii Nicolae și Maya Simionescu în calitatea lor de „visiting professors" la universități americane și canadiene precum și prin participarea lor ca organizatori, președinți sau raportori generali la numeroase manifestări științifice internaționale.

La nivelul Institutului s-au dezvoltat în continuare lucrările asupra transportului transendotelial. Noțiunea și termenul de "transcitoză" a fost introdus în terminologia internațională ca rezultat al acestor cercetări. Într-un articol din revista „Science", în 1993, Anderson subliniază rigurozitatea științifică și valoarea argumentelor cu care Nicolae și Maya Simionescu documentează în mod definitiv fenomenul de transcitoză.

Descrierea canalelor transendoteliale precum și diferențierea segmentelor juncționale intercelulare în endoteliul vascular sunt alte contribuții importante aduse de Nicolae și Maya Simionescu în colaborare cu George Palade.

Acad. Vlad Voiculescu

***

Doamnă profesor Maya Simionescu,
Onorați oaspeți,
Stimați colegi,

Alături de întreaga spiritualitate românească, care a deplâns în această primăvară dispariția unui Eugen Ionescu, a unui Emil Cioran, medicina românească, parte integrantă a științei și culturii de pe aceste meleaguri, deplânge dispariția profesorului Nicolae Simionescu.
Eternitatea pentru Ionescu, Cioran și Simionescu începe în primăvara lui primăvara lui 1995, an care va rămâne în istorie pentru aceste pierderi irecuperabile. De ce simțim așa de acut dispariția profesorului Nicolae Simionescu? În primul rând pentru modelul de om profesionist, de intelectual. Să nu mai amintim de profesionalitatea și farmecul profesorului Simionescu. Pentru, așa cum spunea profesorul Guido Majno, pentru eroismul de a se întoarce pe aceste meleaguri dintr-o țară în care avea aproape tot ce și-ar fi dorit cineva și care i-a recunoscut din plin valoarea. Simțim profund această dispariție pentru faptul că instituția pe care a creat-o, școala, reprezintă într-adevăr ca cea mai durabilă instituție dintr-o societate cu un etalon și un standard nemaiîntâlnit la noi. Resimțim această dispariție pentru verticalitatea omului care a îndrăznit, în vremuri în care niciunul dintre noi nu îndrăznea să spună acele adevăruri. De asemenea, resimțim acut această dispariție pentru faptul că profesorul Simionescu ne-a învățat să prețuim valoarea în știință, în artă sau în literatură și nu în ultimul rând, pentru faptul că ne-a deschis calea către un nou tip de cercetare, nou pentru această țară dar mai ales nou prin ea însăși pentru că distila o viață de om, de morfolog, de fiziolog, de chirurg chiar, și ce școală de viață și de muncă este această chirurgie și iarăși nu în ultimul rînd faptul că a dedicat o viață cercetării fundamentale pentru a elucida probleme încă neabordate și cu tehnici neabordate. Iată deci un model, un om, o instituție, o școală și pentru că toate acestea trebuiau să poarte un nume, un singur nume, i s-a spus "Nicolae Simionescu", Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu". Această instituție va dăinui peste veacuri amintind de ctitorul ei, de acea lumină care a fost la începutul acestei mărețe întreprinderi. Dacă există o ironie în știință atunci cu siguranță aceasta este faptul că endoteliul acela pe care profesorul l-a studiat mai bine decât oricine este și acela care l-a răpus, probabil datorită faptului că a smuls în acest domeniu naturii mai mult decât ar fi trebuit să o facă. De la dispariția profesorului Simionescu avem totuși mângâierea că Dna profesor Maya Simionescu,

cea cu care s-au împletit idealurile, visurile și împlinirile sale, este alături de noi și avem certitudinea că va continua toate aceste visuri și idealuri făcându-le să se împlinească și mai mult. Vom fi cu siguranță alături de dânsa pentru a cinsti memoria profesorului Nicolae Simionescu. Eu personal am un motiv în plus de mângâiere, acela că este alături de mine sau sunt alături de mine Dan și Agneta Simionescu care fără îndoială poartă ceva din filonul de aur al profesorului Nicolae Simionescu. De asemenea trebuie să mărturisesc că port povara, ca exponent al chirurgiei cardiovasculare, că tot ce știm și am învățat n-am putut să oferim profesorului Simionescu pentru a fi și astăzi sau poate mulți ani de acum împreună cu noi. În ce măsură această remarcabilă instituție, pe care profesorul Simionescu a creat-o, a smuls naturii acele secrete foarte bine protejate în patologia cardiovasculară vom vedea în partea a doua a acestei sesiuni în care vor fi prezentate concepția institutului și a profesorului Nicolae Simionescu despre aterogeneză.

Vă mulțumesc.

Prof. Radu Deac

***

Dragă Doamna Maya Simionescu,

Anii petrecuți în IBPC, începând cu marile emoții ale interviului de angajare cu Dumneavoastră (unic în felul lui pentru lumea românească a acelor ani) au reprezentat o perioadă extrem de fericită pentru mine. Acolo am facut cunoștință cu adevărat cu biologia celulară și moleculară, trecând dincolo de litera cărții la experimente pe care nu mi le-aș fi închipuit posibile. Nu voi uita schimburile de replici științifice, și nu numai, din cadrul seminariilor lunilor februarie - martie, sau de la sesiunile S.N.B.C., senzația de mare familie pe care Dumneavoastră și Domnul Profesor ați creat-o după ani de zile de colaborare apropiată cu fiecare cercetător. Oricât de prețios ar suna, sunt sincer mândră că mi-ați oferit ocazia să fac parte din marea familie a IBPC-iștilor. Experiența profesională și umană dobândită în institut mi-a folosit enorm în anii de doctorat de la New York University, SUA și a atenuat incredibil de mult șocul adaptării la lumea științifică americană. În institut am legat prietenii extrem de strânse, cum se spune că numai în anii școlii se întâmplă. Dar ce altceva decât o școala a fost IBPC pentru noi toți? Oriunde m-aș afla, în viitor ca și până acum, îmi voi aminti cu nespusă placere și nostalgie de anii petrecuți în clădirea de pe Strada Hașdeu nr. 8. Și tare aș fi vrut să ne reîntâlnim cu toții, cei noi și cei vechi la acest moment aniversar. Dar cum nu a fost să fie așa, nu-mi rămâne decât să urez "electronic" Institutului, Dumneavoastră și iubiților mei colegi, La mulți ani și multe succese!

Cristina Iftode
New York University, NY, USA

AMINTIRI DIN PREZENT

Ce am primit fiecare dintre noi și purtăm cu noi în permanență indiferent în ce colț al lumii ne-au împins destinele personale? Respectul pentru munca și adevărul științific, grija pentru întreg și în egală măsură pentru amănunt și context. Am învățat ce înseamnă lucrul meticulos și corect, cum să ne comunicăm ideile și rezultatele, cât de importantă și plăcută este munca în echipă. Nu am avut senzația că venim "la lucru", lucrul era parte din întregul vieții noastre și Institutul era a doua familie. Am plâns și am râs împreună, ca orice ființă omenească copleșită uneori de prea multe poveri sau fericită pentru împliniri. Am învățat că schimbarea paradigmelor în știință cere inteligența de a observa și explica lucruri aparent improbabile și perseverența de a le impune lumii științifice cu spirit critic și luciditate. Am învățat că a-ți recunoaște greșelile și imperfecțiunile de moment nu este o rușine, ci o sursă de învățătură pentru mai târziu. Și, nu în ultimul rând, am învățat că știința înseamnă renunțare la multe, multă muncă și răbdare. Sunt, cred, lucrurile esențiale fără de care oricât de învățat ai fi, nu poți face știință de calitate pe termen lung. Șansa noastră a fost că toate aceste lucruri să ne vină sub formă de exemple de la oamenii cu care am lucrat. Ei ne-au dat mereu de-a lungul anilor putere și speranță, ne-au învățat cu dragoste și profesionalism și ne-au corectat greșelile folosind mănuși de catifea. De aceea tot ce am scris mai sus nu sunt simple învățături impersonale, ci poartă învelișul unor amintiri dragi. De aceea sunt atât de persistente și se confundă mereu cu prezentul. La toate acestea se adaugă o imagine care îmi răsare în minte nu de puține ori în diminețile când mă trezesc departe de casă: o clădire alb-roșie, cu trei etaje, însoțită de pomi și flori în care se transmit aceleași daruri și se continuă truda începută cu 20 de ani în urmă cu mintea, inimile și mâinile dragilor noștri Profesori - Maya și Nicolae Simionescu.

Dr. Anca Dobrian
1999

***

O ANIVERSARE CU ÎNALTĂ SEMNIFICAȚIE PENTRU ȘTIINȚA ROMÂNEASCĂ – 25 DE ANI DE LA ÎNFIINȚAREA INSTITUTULUI DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ „NICOLAE SIMIONESCU"

Cu 25 de ani în urmă, ilustrul cercetător, omul de știință Acad. Nicolae Simionescu, a pus bazele institutului care astăzi spre deosebită cinstire îi poartă numele.
Înființarea acestuia a însemnat o nouă treaptă în evoluția unui domeniu modern, biologia celulară și moleculară. Prin dezvoltarea sa impetuasă, condus cu măiestrie și înaltă competență științifică și organizatorică de Nicolae Simionescu, institutul s-a impus rapid în lumea științifică națională și internațională. Opera sa este continuată astăzi cu deosebit succes de cea care i-a fost colaborator apropiat, Acad. Maya Simionescu.

Pentru rezultatele ştiinţifice de o deosebită importanţă teoretică şi aplicativă Institutul de biologie şi Patologie Celulară "Niclolae Simionescu" a primit distincţia de excelenţă.
M-am apropiat de acest institut, încă de la începutul existenţei sale prin preocupările mele legate de biologia celulară, la plante. În acest mod am putut lua cunoştiinţă mai îndeaproape de obiectivele şi tematica sa.
Cercetările întreprinse în domeniul biologiei celulare a endoteliului vascular, a fenomenlor de transcitoză, descoperirea canalelor transendoteliale, studiul modificărilor endoteliului vaselor sangvine în maladiile cardiovasculare sunt câteva dintre subiectele abordate cu predilecţie în institut.
Tehnicile moderne de biologie celulară şi moleculară abordate la Şcolile de vară organizate în ultimii ani s-au bucurat de un interes aparte din partea cercetătorilor. Aşa se face că de la începutul creării sale, institutul a reprezentat o înaltă şcoală pentru numeroşi tineri însetaţi de cunoaştere şi dornici de afirmare.
Activitatea prodigioasă a institutului s-a împletit permanent cu cea a Societăţii Naţionale de Biologie Celulară şi Moleculară înfiinţate la scurt timp (în anul 1982), al cărei preşedinte a fost acelaşi neobosit şi entuziast profesor Nicolae Simionescu, iar după 1985 Acad. Maya Simionescu.
Prin sesiunile sale anuale ţintite pe probleme extrem de actuale, de larg interes ştiinţific, societatea a reuşit să polarizeze, în scurt timp toate forţele din domeniul biologiei celulare româneşti, cu referire la biologia celulară umană, animală, vegetală sau microbiană. Tematici ca: "Mecanisme celulare şi moleculare ale adeziunii celulare", "Polaritatea celulară", "Mecanisme de răspuns ale celulei la factori de agresiune: adaptare, lezare, apoptoză", "Procese moleculare ale senescenţei şi morţii celulare", "Biotehnologia la nivelul secolului XXI", ca şi nelipsitul simpozion de "Tehnici recente în biologia celulară şi moleculară" sunt subiecte puse în discuţie la aceste simpozioane.
Fiecare întâlnire constituie adevărate momente de bucurie în care ne împărtăşim deschis succesele şi neîmplinirile, găsim noi căi de rezolvare ale problemelor dificile şi plecăm de fiecare dată mai bogaţi spiritual.
Volumele publicate, „Current problems in cellular and molecular biology" şi recent „Analele Societăţii Naţionale de Biologie Celulară", „Buletinul Socetăţii Naţionale de Biologie Celulară" cuprind un mare număr de lucrări ale căror rezultate vin să îmbogăţească patrimoniul ştiinţific naţional şi internaţional.
Aniversarea a 25 de ani de existenţă reprezintă o etapă importantă în viaţa instituţiei şi a colaboratorilor săi constituind baza sigură a dezvoltării sale în continuare.
Cu modestie urez institutului, conducătorului acestuia doamna Acad. Maya Simionescu şi colaboratorilor săi deplin succes în cercetarea ştiinţifică spre propăşirea continuă a Institutului de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu".

Dr. Aurelia Brezeanu
Institutul de Biologie, Bucureşti
2004

O ALTĂ LUME

Institutul de proiectare unde lucram când am aflat de postul de la Institutul de Biologie și Patologie Celulară avea dificultăți în procurarea unor noi proiecte. Se vorbea de detașarea unora dintre noi la Pitești, așa că eram dispusă să mă mut, oarecum, oriunde.

Când am ajuns în fața institutului, nu mi-a venit să cred că așI putea avea norocul să lucrez într-o clădire atât de frumoasă și am ezitat să intru, dar pentru că tot făcusem drumul, am îndrăznit și primul om la care am fost îndrumată a fost Doamna Maya. Era în holul de la intrare, o doamnă slăbuță, cu o privire vie, îmbrăcată cu o fustă neagră cu trandafiraşi și un tricou alb cu aceeași bobocei de trandafir. M-a cucerit această prezență atât de feminină, dar am intrat în panică aflând că e soția directorului. Nu-mi amintesc tot ce am vorbit cu dânsa, dar reținc că mi se adresa foarte natural. M-a rugat să dau o probă de scris, dar îmi tremura atât de tare mâna, încât dânsa dorind să mă scoată din dificultate, m-a întrebat dacă nu am vreun desen făcut de mine sau ceva scris. Salvarea a venit de la agenda mea de telefon, ponosită, dar scrisă în momente de calm. Mi s-a adus apoi un vas de plastic pe care am scris cu un marker numărul 103, adică Laboratorul de organele, pe atunci. M-au lăsat singură, m-am liniștit și totul a ieșit bine.

Am aflat că deși dânsa mă acceptase, trebuia să merg și în audiență la Domnul Profesor. Audiențele se țineau în după-amiaza zilei următoare. Când am ajuns, era plin de oameni în hol și am fost îndrumată către secretariat, unde trebuia să confirm sosirea. Acolo era un domn sobru, impecabil îmbrăcat cu cămașă albă, sacou și cravată (era vară). Văzând așa un secretar, m-am întrebat, oare cum o fi directorul. Când am început să lucrez în institut am constatat că distinsul „secretar" nu era altul, decât Doctorul Hillebrand, care în acea după-amiază fusese de gardă. Domnul Profesor, o prezență ieșită din comun, un interlocutor ferm și totuși uman, după ce a aflat ce am lucrat până atunci, mi-a dat să desenez un suport de plastic, pe care era o rolă consumată de scotch. Am mers într-un laborator, unde mai erau două desenatoare, tot cu câte un suport în față. După ce am revenit la Domnul Profesor în cabinet, mi s-a părut corect să-i reamintesc ce salariu aveam și am comentat jenată că nu cred că-mi va putea da la fel de mult ca să desenez asemenea nimicuri. La fel de impenetrabil mi-a mulțumit și mi-a spus să aștept un răspuns acasă. Am plecat foarte descumpănită și mare mi-a fost nedumerirea când spre seară am primit un telefon prin care eram invitată să vin a doua zi să-mi iau hârtiile prin care solicitam transferul. Așa am ajuns eu la Institutul de Biologie și Patologie Celulară.

APARATUL GOLGI

Foarte curând, după sesiunea inaugurală, Domnul Profesor m-a chemat să-mi dea de lucru. Era ceva asemănător cu o celulă, era chiar o celulă cu vezicule, mitocondrii, nucleu și încă ceva. Acel "ceva" semăna cu o aglomerare de „pișcoturi", drept care l-am întrebat, dacă formațiunea aceea trebuie așa grupată. Le-am zis „pișcoturi" și

imediat am simțit că ceva nu e în regulă. Mi-a adresat o privire contrariată și m-a întrebat, cum de știu despre aparatul Golgi? Era un cuvânt cu totul nou pentru mine. M-a cuprins o panică cumplită, pe care Domnul Profesor a sesizat-o și ca să destinda atmosfera, mi-a spus că ar trebui să scriu, ca pedeapsă, de o sută de ori, cuvântul cu pricina, pe care mi l-a caligrafiat, calm, cu un creion impecabil ascuțit. A doua zi, când i-am adus desenul, aveam în mână un caiet unde scrisesem de o sută de ori aparatul Golgi.
Peste un timp am aflat că pe câinele Doamnei Maya și al Domnului Profesor îl chema Golgi.

DOUĂ SCAUNE!

Ce mă fascinase cel mai mult în atelierul meu de lucru, nu era planșeta impecabilă și mult diferită de cea plină de găuri de la pioneze, pe care lucrasem până atunci, ci scaunul cu rotile. L-am îndrăgit de cum m-am așezat pe el. Aveam două scaune cu rotile.
Într-o bună zi sosesc de la specializare din SUA doi cercetători și mă trezesc cu Lixăndrel, administratorul, că vine să-mi rechiziționeze scaunele. Când am încercat să-l înduplec să-mi lase măcar unul, mi-a replicat că e dispoziția Doctorului Neacșu. M-am simțit atunci foarte nenorocită și am început să plâng. Când suspinam eu mai cu elan, sună secretara și mă invită la Domnul Profesor. M-am spălat repede pe ochi și m-am dus. Dânsul a observat imediat că plânsesem și n-a trebuit decât o întrebare amabilă ca eu să izbucnesc iar în lacrimi. După ce a realizat amploarea "catastrofei" m-a trimis să mă liniștesc și m-a rugat să revin peste zece minute. Când am sosit a început imediat discuția despre ce aveam de lucru. La întoarcerea în atelierul de grafică, nu mică mi-a fost mirarea văzând cele două scaune tronând în mijlocul camerei.
Cinci ani mai târziu mă căsătoream cu Doctorul Neacșu.

NOCTURNE

În vremea sesiunilor rămâneam împreună cu Mihaela, după program, să terminăm ceea ce peste zi nu se putuse face. Deși mai prin toate laboratoarele găseai încă cercetători, fiecare era cufundat în treaba lui și nimeni nu ne mai deranja, iar noi două buchiseam concentrate la desenele noastre. Erau lungi perioade de tăcere acompaniate de ochestra greierilor. Într-o seară au început să ciripească niște păsărele și probabil m-a deranjat zgomotul care se suprapunea peste concertul meu preferat. Atunci am rugat-o pe Mihaela să închidă "butonul". Ea a înțeles întotdeauna ce spun, chiar dacă exprimarea mea suna ciudat pentru ceilalți. Plecam apoi spre casă amândouă și ca să ne dezmorțim încheieturile de atâta stat pe scaun, o luam prin cartierul Cotroceni și urcam pe jos până la Academia Militară. Ne îmbătam cu parfumul florilor de Maica Domnului și ne refăceam puterile pentru a doua zi.
De câte ori aud cântând greierii, trimit un gând duios serilor petrecute în atelierul de grafică din institut.

PRIMA ANIVERSARE

La împlinirea unui an de la Sesiunea inaugurală din 3 Septembrie 1979, se hotărâse ca, după Sesiunea Științifică, să sărbătorim în institut realizările unui an de muncă. Nici unul dintre noi nu știa cum trebuie să arate o astfel de sărbătoare. Deci, era aniversarea cuiva de un an, putea fi un copil, copilul Domnului Profesor, căci în mintea dânsului se născuse ideea înființării acestui institut. Am făcut rost de o păpușă, pe care am îmbrăcat-o în bebeluș. Apoi au început să curgă ideile. Bebelușul a fost așezat într-un leagăn. Doamna Moldoveanu i-a brodat pe babetică sigla institutului. Ca puiul nostru să nu flămânzească, la prima lui aniversare, i-am pus lângă el două biberoane, unul cu Serotonină, altul cu Feritină, două substanțe cu care lucrase Ina Heltianu pentru a pune în evidență receptorii la histamină. Nu știam cum vor primi Doamna Maya și mai ales Domnul Profesor gluma noastră. Au fost amuzați de idee și ne-au rugat ca bebelușul să rămână în institut. La aniversările ulterioare, veneau mândri, purtând între dânșii mascota institutului.
Pe primul lui tort am desenat cu frișcă sigla. A fost o petrecere de neuitat.
Peste 15 ani, adăugam pe siglă inițialele N.S.

LA PAISPREZECE ANI

Conform tradiției, după Sesiunea Științifică, în fiecare an, urma o petrecere în familie. Sărbătoarea se ținea în „octocel" celula octogonală din aluminiu și sticlă, care adăpostea o parte din postere. Panourile erau împinse cât mai mult spre pereții celulei și în mijloc se puneau măsuțe pliante și scaune. Toată lumea aducea bunătăți și abia așteptam să fie lăudate și realizările noastre culinare.
Acum institutul împlinea 14 ani, așa că în comitetul nostru de organizare am gândit că e momentul să-i oferim un buletin de identitate ca oricărui cetățean. La capitolul părinți, Maya și Nicolae Simionescu.
Am făcut cocarde la acea aniversare. S-a citit prezența după condica din septembrie 1979.
Pe pereții din sticlă apăruseră altfel de postere, cu alte realizări decât cele profesionale. Acolo erau trecute numele tuturor copiilor care se născuseră de la înființarea institutului, erau enumerate familiile celor care se cunoscuseră în institut, precum și a celor care-și întemeiaseră o familie cu cineva din afara institutului.
Pentru prima oară însă, Domnul Profesor a întârziat la o întrunire. Nimeni nu știa ce se întâmplă. Adriana, secretara dumnealui, era mută și foarte abătută. La un moment dat, a apărut zâmbitor, și-a cerut scuze pentru întârziere, s-a bucurat de surprizele pregătite, dar mai tot timpul a stat sprijinit de unul din stâlpii din centrul octocelului. Era palid. S-a retras mai repede ca alte dăți, dar a rămas cu noi Doamna Maya. N-am aflat nimic în ziua aceea, abia mai târziu, am auzit că îl necăjea inima.

INSTITUTUL MEU

Institutul meu și al tuturor celor care-l poartă în inima lor este o clădire modernă, dar sobră, cu spații generoase și ferestre mari ca să pătrundă cât mai multă lumină,

căci e nevoie de ea atât fizic, cât și metafizic.
Între pereții lui m-am simțit onorată de a lucra, dar și protejată de impostură și prostie. Am trăit alături de colegii mei, implicați în cercetare, dorința de cunoaștere, plăcerea competiției și satisfacția rezultatelor. Am fost o mică rotiță în acest mecanism magic care creează specialiști și aduce totodată contribuții esențiale științei în domeniul biologiei celulare, dar unde s-au cizelat caractere și s-au deschis noi orizonturi celor care s-au lăsat prinși în vibrația unică a unor oameni deosebiți: Doamna Maya și Domnul Profesor.
Aceasta este singura clădire pe lângă care atunci când trec, retrăiesc cu emoție cele mai multe realizări ale mele și știu că, în intimitatea ei va sălășlui întotdeauna o parte a sufletului meu.

Corina Neacșu
2004

***

SFÂRȘITURI DE AN ÎN IBPC

După ce viața științifică a început să pulseze în institut și se cristalizase un colectiv de „lucrători științifici" formați din înăuntrul și din afara țării (prin bursele obținute de Profesor la diferite institute de profil din lume), activitatea în acest „stup" al cercetării în ale biologiei celulare a căpătat un caracter deosebit: se formase o comuniune familială ce cuprindea în efervescența trăirilor entuziaste și membrii familiei fiecăruia care nu erau pe "statul" de plată al institutului.
Aniversările de nume, după dorința „conducerii", se făceau prin „grija" celor care erau sărbătoriți, iar Crăciunul și Anul Nou prin „adunare generală", cuprinzând toți membrii familiei, inclusiv cei care nu erau încă la grădiniță.
An de an, Pomul de Crăciun (alias de Iarnă) aduna în jurul său și al lui Moș Crăciun (cu barbă și costum adecvat), toată suflarea schemei institutului - inclusiv însoțitorii de acasă ai fiecăruia - în frunte cu organizatorii și sponsorii de bază: Profesorul și Doamna Maya.
Se spuneau glume, scheciuri, pamflete și chiar un plugușor, care purta pecetea anului care se termina.
Se „petrecea" sufletește și gastronomic corespunzător entuziasmului culinar al exponentelor feminine din schemă și nu numai. Se trecea din an în an cu pasarea ștafetei de dragoste și omenie spre consolidarea tânărului echipaj al instituției ce purta sigla IBPC... astăzi și "Nicolae Simionescu".

Dr. Constantin Neacșu
2004

***

AMINTIRI LA UN SFERT DE VEAC – IBPC NS 1979 - 2004

Suntem dintre cei care cunosc (și recunosc) din proprie experiență caracterul unic al Institutului, dat de modul cum a fost conceput, organizat și condus, în intenția de a-i forma pe membrii săi ca oameni de știință. Activitatea de laborator, seminariile, discuțiile periodice, redactarea lucrărilor, simpozioanele internaționale, activitățile culturale - toate au avut marca personalităților inconfundabile ale creatorilor lui. Fiind totdeauna alături, ei și-au pus amprenta de savanți, de profesori și de oameni de cultură pe Institut, adică pe noi cei care am avut șansa de a lucra acolo.

E foarte greu să alegem acum între miile de amintiri care ne leagă de acele zile de aur ale Institutului. Dar să luăm, de exemplu, examenele de doctorat (de admitere sau colocviile). Pentru noi, candidații, pregătirea acestor examene a fost ca a doua universitate, confirmând misiunea Institutului de a fi nu numai o unitate de cercetare de nivel mondial, dar și una de învățământ, la același nivel. Ni s-a dat mult și ni s-a cerut mult. Au fost trei elemente care au contribuit la asta: (a) Programa, care a facut o acoperire excelentă a biologiei celulare, văzută dinlăuntrul ei, ca de cei care au contribuit la însăși formarea disciplinei; (b) Biblioteca, dotată cu revistele și tratatele de bază ale domeniului; (c) "Sala de consiliu", unde s-au putut consulta publicațiile de ultimă oră, o colecție impresionantă de reprinturi cerute de noi prin „Current Contents", într-o vreme când puțini oameni de știință din Europa de est abia auziseră de acest sistem de informare. În particular, un mare impact credem că l-a avut folosirea ca referință a manulalului „Molecular Biology of the Cell" de Alberts et al., până azi nedepășit decât de re-editările lui îmbunătățite. De aceea, fiecare examen a fost pentru noi o sărbătorare, căci ne justifica dedicarea unei cantități apreciabile de efort lecturii și studierii lui „Alberts". Aceste ocazii ne creau o imensă satisfacție, deoarece puteam să înțelegem un mare număr de lucruri, despre care aflam de ce sunt așa cum sunt. De asemenea, iluminante erau pentru noi erau examenele orale, adevărate dialoguri unde învățam despre subiecte mai mult chiar decât spuneam!

În Institut se muncea serios, dar se și… juca serios! Mai puțin în pauze, dar cu siguranță în „programul" de tenis de câmp inițiat chiar de domnul Profesor și de doamna Maya. Așa ne-a adus în conștiință nevoia exercitiului fizic și a relaxării mentale, atât de necesare vieții moderne, dar atât de străine spiritului de înregimentare socialist. Terenurile selecte de la „Tenis Club", atmosfera destinsă, neprotocolară, unde am întrezărit dimensiunile umane atât ale colegilor noștrii, cât și ale familiei Simionescu. Ne stimulau și înclinațiile speciale pentru tenis ale lui Mugurel Badea și ale lui Victor Jinga, care povesteau despre mirifice terenuri și meciuri amicale de peste ocean, în vremea șederii lor în America.

S-a întâmplat odată că nici unul din colegii noștrii nu a venit la tenis într-o duminică dupa-amiază, decât eu (N.M.). Domnul Profesor și doamna Maya au venit însă. Obișnuiam să jucăm la dublu și inainte, dar acum situația era destul de incomodă pentru mine. Eu eram un începător, care făcea ce-i stătea în putință de unul singur, ceea ce nu însemna prea mult: alergam mult pe teren, nu cu prea mare folos, dar

făceam față. Domnul Profesor a realizat că va fi dificil pentru mine, dar a vrut probabil să mă încerce. M-a întrebat dacă vreu să joc și am acceptat provocarea. Era o împrejurare când eram testat dincolo de capacitățile mele obișnuite. Am simțit că domnul Profesor vrea să îmi dea o lecție, să îmi arate că dacă am încredere că pot, voi reuși, și să nu mă las intimidat de situație, care era destul de jenantă pentru mine (ținând cont de timiditatea mea înnăscută). Spre mirarea și încântarea mea, jocul a mers bine. Curând m-am încălzit și simțeam că „dau" din mine mai mult ca de obicei, nu atât cât credeam eu că pot, ci atât cât domnul Profesor îmi cerea. Mă simțeam din ce în ce mai bine și cred că n-a fost o partidă slabă. Dar mesajul a fost clar pentru mine: "Crezi că poți și vei putea!".

Ce bine era daca aș fi pus asta în practică de atunci… Dar mai târziu, m-am amintit de această împrejurare de multe ori. Domnul Profesor mi-a pus în mână cheia sucessului (și) pe terenul de tenis; rămânea doar să o folosesc, la timpul potrivit.

O altă împrejurare, asemănătoare, a fost legată de ieșirea la ski, la Poiana Brașov. Învățasem să skiez de curând, și, din nou, activitatea era o solicitare dincolo de domeniul obișnuitului. Domnul Profesor și doamna Maya erau printre noi și ne urmăreau atenți. Pe pârtia de la Drumul Roșu, am trecut de câteva ori zburând ca vântul. Poate m-aș fi oprit în vreun brad, dar gândul ca „iată, e alt test pe care e bine să-l trec și că pot să-l trec" ("dacă și Profesorul crede asta!") mi-a dat siguranță. Și, într-adevăr, domnul Profesor a părut plăcut surprins de cum skiam, pentru că, eram, evident un începător, dar curajul ținea locul experienței și mi s-a părut că apreciază asta în mod deosebit. Celor ce eram pe pârtie la ora aceea ne-a spus „zmei" și ne-am simțit mândri de asta. Încă o dată, domnul Profesor își exersa charisma formătoare, arătându-ne chiar prin propriile noastre confruntări cu necunoscutul și cu pericolul ceea ce are, într-adevăr, valoare.

Domnul Profesor era uneori, mai ales în ultima perioadă, preocupat și îngândurat. Simțeam că pe umerii săi stăteau grave probleme ale științei, ale administrației și ale politicii și, poate, ale sănătății. Asta îl făcea să pară distant câteodată, dar am am avut prilejul să mă conving că asta nu era decât o aparență. Într-o după-amiază am fost programat la o discuție în biroul dumnealui (cel nou). Cred că avea să-mi spună, sau să mă întrebe ceva despre organizarea unei comemorări, ca de exemplu cea a lui Brâncuși, sau poate a unei zile a Institutului; nu mai știu. Dar îmi amintesc ca acum, că după subiectul propriu-zis, domnul Profesor nu m-a „expediat", ci a început să-mi povestească altele, tot legate de cultură. Mi-a spus de exemplu, ce mult îi place să asculte „Concertul pentru vioara" de Bruckner și despre faptul că în viață a scris și chiar a publicat literatură, sub pseudonim… Până azi am rămas cu dorința de a afla care au fost acele cărți (sau poezii?) și care a fost numele lui de literat…

Printre multe alte momente remarcabile din acea vreme, întoarcerile în țară ale Profesorului și doamnei Maya din America, unde mergeau în fiecare an pentru un semestru universitar, erau adevărate evenimente. Mergeam să-i așteptam la aeroport după Anul Nou, cândva prin ianuarie. Pentru noi, cei ne-ieșiți din țară, însuși aeroportul era ceva misterios, chiar periculos. Securitatea mișuna peste tot și paza strictă arăta

cât de mult „lagărul socialist" era de fapt, un lagăr!
Ceea ce ne-a uimit și ne-a încântat întodeauna era caă domnul Profesor și doamna Maya reveneau, cu regularitate de anotimp, în lagăr. Ne era și nouă clar că o faceau din ce în ce mai greu, dar trăiam cu sentimentul că, de fapt, noi reprezentam familia lor lărgită și întoarcerea la București era pentru dânșii de două ori o întoarcere acasă… Și nu veneau niciodată cu mâna goală: cadourile noastre erau tonele de chimicale, de instrumente și mai ales de cărți și de reviste, care reprezentau adevăratul „combustibil" al Institutului, pe ani de zile. Alt combustibil nu prea aveam: înghețam în hainele de ski în Institut, pentru că se „tăiase" căldura, încât precipitau soluțiile cu SDS în tampoanele de electroforeză…! Iar dr. Sampath Parthasarathy care venise la unul din simpozioane, l-a întrebat pe Aurelian Radu pe Calea Victoriei, seara, în taxiul de la aeroport: "Am ajuns oare în București…?". Gândindu-se poate la acest întuneric, când ne-a revăzut la aeroport, doamna Maya a oftat: "Dacă ați vedea cum sunt pomii de Crăciun în America… Câte lumini, câtă feerie!".
Ne gândim acum, că poate dorința unora dintre noi de a lucra în Occident a fost (desigur, involuntar) cultivată de aceste adevărate spectacole ale revenirii. Multe lucruri pe care le-am auzit de la dânșii, atunci și cu alte ocazii, ne-au stârnit curiozitatea. Dar când am ajuns dincoace de Ocean, am putut cunoaște realitatea, nu așa de grozavă peste tot. Ne-am spus apoi de multe ori, cu naiva uimire, că lucrurile "vai, nu sunt ca în Institut"! Căci Institutul a rămas și va fi întodeauna pentru noi, sistemul de referință.
Da, viața merge înainte, ca vârful copacului care crește. Dar se poate desprinde vreodată vârful de rădăcini?

Nicanor și Leni Moldovan
Davis Heart and Lung Research Institute
Ohio State University, Columbus, OH, USA.

***

Onorată Asistență,
Stimați Colegi,
Dragi Prieteni,

Astăzi, la ceas aniversar, copleșiți de emoție, reînviem din cotloane ascunse ale sufletului calde amintiri din anii tinereții, ce s-au împletit în mod fericit cu existența acestui Institut. Aducem astfel, recunoștința noastră tuturor celor care cu fermitate dar și cu blândețe, ne-au călăuzit pașii pe drumul, adesea anevoios, al vieții, omagiind o dată în plus, prin prezența noastră, memoria Profesorului Nicolae Simionescu, ilustră personalitate a științei românești.
Singurul lucru care imi da curajul sa ma adresez D-voastră, acum și aici, este sentimentul că mă aflu printre ai mei, acasă, în sânul unei mari familii, ai cărei membri,

si-au lasat pentru cateva ceasuri preocuparile cotidiene și s-au adunat pentru a cinsti prin prezenta lor acest lăcaș.
Spun asta cu convingerea că fiecare dintre cei ce au ținut să fie azi de față, la ceas aniversar, păstrează în amintire Institutul mai mult decât ca pe un simplu loc de muncă. Cu toții simțim încă vie căldura sufletească pe care acesta o emană. Ne leagă de el nu doar nostalgia tinereții, ci și faptul că într-un fel sau altul, pentru fiecare dintre noi, întâlnirea cu Institutul reprezintă un punct ce ne-a marcat destinul.
O vorbă veche spune că „omul sfințește locul". Este prefect adevărat, dar eu cred și în reciprocitatea acestei teorii. Cred că și locul poate sfinți oamenii, îi poate înnobila, îi poate face mai puternici, mai serioși, mai buni, mai generoși. Un astfel de loc e Institutul de Biologie și Patologie Celulară, ce poartă astăzi in semn de respect și prinos de recunoștință numele unuia dintre cei doi ctitori ai săi: Prof. Nicolae Simionescu. Aici, de-a lungul a 25 de ani s-a creat nu doar știință. S-au făurit destine.
Acest "lăcaș de cultură în care se face știință", așa cum inspirat îl definea Profesorul, s-a născut din vise și speranțe și a fost pus în operă cu pasiune, inteligență și o muncă neobosită. Și, de aceea, el nu se putea limita doar la creația științifică. Mai presus de orice, el a modelat OAMENI cu caractere puternice, creând punți de legătură inter-umană.
O paranteză: vorbeam acum câteva zile cu D-na Maya și, mai în glumă, mai în serios, i-am spus că în Institutul nostru s-a descoperit nu doar ABP-ul - Albumin Binding Protein, adică proteina care leagă albumina, ci și probabil PBP-ul - People Binding Protein, adică proteina care creează punți de legatură între oameni.
Alături de zestrea genetică, de educația primită în familie și în școală, în desăvârșirea personalității individului, un rol deosebit îl are atmosfera de la locul său de muncă. Prin intermediul, ei un om își poate descoperi valențe nebănuite, își poate accentua sau remodela trăsăturile pozitive sau, din contră, pot ieși la iveală trăsături latente ce urâțesc firea umană.
Cu măiestrie de bijutieri, cei doi mentori ai noștrii, Dl. Profesor și D-na Maya Simionescu au șlefuit caracterele tuturor celor ce le-au fost aproape, dându-le străluciri de diamant. Bineînteles că numărul karatelor a ținut de fiecare dintre noi în parte.
Puterea exemplului personal, perseverența și plăcerea cu care reușeau să-și depășească propriile standarde, din ce în ce mai ambițioase, și-au pus în mare măsura amprenta și asupra noastră, a celor ce timp de atâția ani le-am fost colaboratori. Seriozitatea și respectul reciproc au reprezentat un model pe care ni l-am însușit cu totii, aplicându-l nu doar în relațiile profesionale, ci și în cele de familie.
Am păsit pragul acestui institut la vârsta de 19 ani, venită direct de pe băncile școlii. Pentru tinerii de azi, ce au la dispoziție Internetul și zeci de canale de televiziune, șocul nu mai poate fi același. Dar pentru o adolescentă, în 1979, în plină eră comunistă, impactul a fost colosal. Obișnuită cu peisajul anost al clădirilor vechi și sobre ale Facultăților de Biologie și Medicină Veterinară (unde făcusem practica în timpul liceului), intimidată de clădirea impunătoare a Facultății de Medicină, intrarea în

clădirea din aluminiu și sticlă a Institutului mi-a tăiat răsuflarea, mi-a dat sentimentul că am patruns într-o altă lume, într-o altă țară. Dar șocul nu s-a oprit aici. Denumirea primului laborator pe care l-am văzut scris pe o ușă m-a uluit: „Citofarmacologie". Nu îmi venea să cred. Aspectul laboratoarelor, aparatura, halatele cu sigla institutului, toate îmi păreau a fi frânturi din documentarele de la „Teleenciclopedia". Totul mă copleșise și nu mi-aș fi închipuit vreodată că voi putea ajunge să lucrez aici.

Mi-am depus cererea de angajare, dar mi s-a spus să revin în ianuarie, pentru că Dl. Profesor Simionescu și D-na Maya Simionescu plecaseră în America și urmau să se întoarcă abia peste 3 luni. Pentru mine acest fapt era de-a dreptul halucinant. Cum se putea ca niște oameni odată plecați în AMERICA, să se mai întoarca... în ianuarie. De ani de zile bunicii și parintii mei ascultau „Europa liberă" și „Vocea Americii" și știam că, cine reușește să plece acolo, nu se mai întoarce niciodată.

Și, totuși, în ianuarie... cei doi s-au întors. S-au întors, pentru că aici era împlinirea visului lor.

Pentru mine a urmat apoi interviul cu Dl. Profesor Nicolae Simionescu. Atitudinea sa, plină de jovialitate și condescendență, m-au făcut să depășesc emoțiile primului meu interviu. Acest moment a reprezentat pentru mine trecerea graniței dintre adolescență și maturitate. Am simțit pentru prima dată ce înseamnă să fii luat în serios și ce înseamnă să-ți asumi o responsabilitate.

Au trecut 25 de ani de atunci! La scara istoriei nu este decât un fir de nisip pe țărmul mării. Dar pentru o viață de om înseamnă foarte mult. E o perioadă ce practic se confundă cu tinerețea mea, cu prieteniile, puține, dar trainice, legate în acești ani, a căror trăinicie nu au putut-o știrbi nici timpul și nici distanțele.

Sunt 25 de ani în care dintr-un copil, am devenit pe rând soție și mamă a trei minunate fete, reușind să trec cu dinții strânși peste inerentele obstacole ale vieții. Am încercat, urmând exemplul minunatului cuplu format de ctitorii acestui institut, să îmbin viața de familie cu cea profesională. E o rețetă care, aplicată cu seriozitate, dă rezultate pe ambele planuri.

În incheiere, dar nu în ultimul rând, aș dori să subliniez colaborarea cu totul specială cu D-na Maya Simionescu, clădită pe un imens respect și o mare admirație, pentru care întotdeauna am considerat, că nici un efort nu este prea mare și față de care se îndreaptă toată dragostea și recunoștința mea.

Vă mulțumesc și aștept să ne revedem la Aniversarea a trei decenii de activitate.

Marilena Daju

***

GÂNDURI SCRISE SAU SPUSE...

DESPRE CELULĂ

„Celulele reprezintă Universul redus la esență de la care societatea ar avea multe de învățat. Înțelepciunea la care te îndeamnă este respectarea sinelui și, în același timp, respectarea „celuilalt", conviețuire în armonie".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„Există multe pilde pe care le capeți studiind viața celulelor. Cu cât le studiez mai îndeaproape, cu cât cred că le înțeleg mai bine, mă uimesc formulele directe și regulile simple cu care, cele trei miliarde de celule ale corpului uman, își desfășoară funcțiile răspund provocărilor mediului înconjurător, se adaptează, evoluează, se divid și, în final, mențin viața. Am învățat că celulele organismelor vii în timpul a milioane de ani de evoluție, prin mijloace simple, au reușit ceea ce societatea umană se străduie să reușească, anume să viețuiască, să comunice și să se dezvolte în armonie ele între ele și, în același timp, cu mediul înconjurător. Celula, unitatea fundamentală a vieții, a găsit mecanisme înțelepte prin care să acomodeze entități aparent opuse: armonia între unitate și diversitate, între identitate și cooperare, între identitate și integrare".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„Am convingerea că celula este pacientul secolului XXI".
(Maya Simionescu)

„Cercetările (in biologia celulară, n.r.) au dus la înțelegerea faptului că „celula este sediul vieții și al bolii" și când vom înțelege pe deplin limbajul celulelor, vom câștiga bătălia împotriva acestor boli ucigătoare (boli cardovasculare, n.r.)".
(Maya Simionescu, Ziua – 10 ianuarie 2005)

DESPRE CERCETĂTORI

„Ideea curioasă pe care o auzi uneori că noi am putea fi importatori și beneficiari ai rezultatelor obținute în alte țări, în afară că umilește inteligența românească, nu este posibilă, deoarece utilizarea creației științifice o pot face doar cei pregătiți în domeniu."
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„Cercetătorii veritabili sunt, după mine, o speță aparte. Ce vor ei? În primul rând, condiții de lucru, tehnologie modernă, aparatură performantă, modalități de informare, cum sunt abonamente la reviste științifice, acces la cărti publicate în edituri internaționale, internet, posibilitatea de a-și prezenta rezultatele la congrese naționale și internaționale, de a publica în reviste științifice (care deseori cer taxă de publicare). În al doilea rând, și foarte important, ei cer condiții de viată demne (în

traducere: salarii)".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„Domnilor, vă rog nu umiliți inteligența românească! Nu umiliți eforturile unor oameni care prin liberă alegere stau în România și mai ales fac tot ce pot să producă știință bună. Nu-i ignorați pe aceștia".
(Maya Simionescu, Curentul – 8 octombrie 2001)

„Lumea se globalizează azi. Dar pentru știință, asta s-a întâmplat de mult. Știința nu are granițe naționale, dar fiecare națiune are nevoie de știință, pentru că știința nu se poate importa sau chiar cea care se importă trebuie să fie întâmpinată de oameni pregătiți. De aceea, eu mă uit cu smerenie la toți cei care nu se sperie, nu se blazează și continuă să mențină pe mapamond știința românească".
(Maya Simionescu, Curentul – 8 octombrie 2001)

„Vedeți că mă refer mereu la cercetătorii veritabili. Ca și în alte domenii, lumea științei este poluată de neaveniți și nechemați. Cred că trebuie găsit un mecanism social prin care aceștia să fie distribuiți unde se potrivesc. Ne trebuie un sistem de criterii și un grup de evaluatori care, cu blândețe intransigentă să pună cercetătorii și proiectele de cercetare pe o reală scară ierarhică a valorii".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„... dăruirea cercetătorior (de la IBPC, n.r.) a întreținut o stare de spirit în care să te bucuri pentru ce ai descoperit și te strădui ca în fiecare zi să înțelegi lumea în general și lumea dinăuntrul nostru în particular, propriile noastre celule".
(Maya Simionescu, Ziua – 20 septembrie 2004)

„...cercetătorul nu umblă pentru recunoaștere publică, umblă pentru cunoaștere, iar când o găsește, chiar în parte, simte nevoia să o comunice în publicații științifice, iar când se acumulează multe date, ele sunt uneori adunate într-o carte".
(Maya Simionescu, Ziua – 10 ianuarie 2005)

DESPRE CERCETARE

„Cercetarea științifică este mai mult decât o profesie, este un mod de a trăi, cu strădanii reușite alături de încercări nereușite, iar între ele marea agitată a îndoielilor care te invită la înțelepciune. Iar în lupta dintre bucuria succeselor și amăreala eșecurilor, principalul instrument de conservare rămâne pasiunea".
(Nicolae Simionescu)

„În viitorul apropiat, știm înspre ce ne îndreptăm, dar nu știm ce vom găsi… Am elaborat planuri, dar nu și predicții, pentru că, în realitate, dacă lucrurile ce vor fi găsite vor fi într-adevăr noi, ele sunt prin definiție necunoscute azi. Suntem tonifiați de fiecare observație nouă și, în același timp fericiți că suntem atât de ignoranți încât să facem din fiecare zi, când reintrăm în laborator, o confruntare cu propriul nostru intelect."
(Nicolae Simionescu - 1980)

„Cercetarea este un act de creație care, pe lângă neliniștea căutătorului, cere și liniștea actului în sine. Pentru liniștea mentală a cercetătorului este necesară asigurarea condițiilor respectabile de trai și un statut social potrivit funcției lui. Ce se poate face? Cred că este important ca cei care iau hotărâri pentru destinele cercetării românești să evalueze bine dorințele și putințele noastre. Eu cred că, în condițiile României de azi, este greu să faci cercetare performantă, dar nu este imposibil! Societatea (mă rog, statul) trebuie să sprijine cercetarea fundamentală și în special cercetarea fundamentală direcționată, care, cu siguranță, mai repede sau mai încet, devine baza fără de care nu se poate dezvolta bine, cercetarea aplicativă. Fără cultură (prin cultură înțelegând și știință) nu se poate imagina dezvoltarea societății".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„Până la urmă, ajungem la fondurile alocate cercetării și, egal de important, la distribuirea lor. Cu cât fondurile sunt mai mici, distribuirea lor este mai importantă. Există o masă critică de finanțare a unui proiect de cercetare. Sub această masă critică, fondurile care se dau unui proiect sunt o risipă, deoarece cu ele nu poți realiza proiectul și se risipesc fără nici o finalizare. Dacă unui proiect de cercetare, care ar costa 200 milioane de lei, îi dai un grant de 20 milioane, realizarea lui nu are nici o șansă".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„Știința începe cu o întrebare și aceasta este continuată de o mare curiozitate intelectuală. Dacă întrebarea este importantă și curiozitatea te neliniștește, dacă ai înțelepciunea și șansa să alcătuiești o echipă de cercetători talentați, genuin interesați în știință, dacă muncești fără încetare, dacă te chinuie un rezultat pe care nu-l înțelegi decât dacă mai faci încă 20 de experiențe care cer alte șase luni de lucru, dacă te culci seara cu o idee și accepți a doua zi că nu a fost ideea cea mai bună și o iei de la capăt cu aceeași dorință, dacă accepți eșecurile și reușitele cu același calm și determinare, rezultatul final al cercetării tale poate fi foarte bun".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„Cred că va veni momentul când în discursul politic o să apară și cuvântul "cercetare", alături de educație și învățământ și când se va înțelege că finanțarea cercetării fundamentale nu este o subvenție, ci o investiție pentru un viitor mai bun

al societății... Un cercetător și o cercetare bună costă scump, dar un cercetător și o cercetare mediocră costă cu mult mai mult".
(Maya Simionescu, Ziua – 9 mai 2005)

„Grant-urile sunt o formă bună de finanțare a proiectelor de cercetare științifică. Ele se folosesc de multă vreme în lume, iar la noi în țară au fost introduse pentru prima oară în Academia Română de către acad. Nicolae Simionescu. Primite cu multă reticență la început, ele au fost apoi preluate atât pentru finanțarea cercetării din învățământ, cât și pentru cercetare aplicativă".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„Filizofia de bază este ca cercetătorii să vadă, să creadă și să se convingă de faptul că lucrează într-un proiect important, că rezultatele lor bune sunt apreciate de comunitatea științifică națională și internațională, că insuccesele în știință sunt multe, dar nu descurajatoare, că ceea ce nu înțelegi azi, mâine ar putea să devină limpede, că ei fac parte dintr-o lume uneori neînțeleasă, dar o lume plină de fascinația descoperirii "necunoscutului" care există în jurul nostru sau chiar în noi înșine. Dacă reușești să faci asta ani și ani la rând, să transmiți neliniștea căutării și bucuria găsirii, dacă perseverezi în credința cercetării, ai șansa să creezi o "școală științifică"".
(Maya Simionescu, Ziua – 9 mai 2005)

„Cercetarea este un act de creație. Cere libertate! Descoperirile nu se pot comanda; în cercetare știi ce cauți, dar nu ce vei găsi, fenomenele noi sunt prin definiție necunoscute. Înveți în timp să tratezi egal cei doi "ínamici": bucuria succeselor și amărăciunea eșecurilor".
(Maya Simionescu, Jurnalul Național - 24 februarie 2009)

„Cred că cercetarea științifică de calitate și cercetătorii genuini, veritabili, sunt o avuție națională. Bogăția unei țări se măsoară în primul rând, cred eu, prin talentele și valorile cu care contribuie la patrimoniul cultural național și universal. Cercetarea științifică la noi este, în bună parte, de valoare, dar la ora actuală se află foarte aproape de marginea supraviețuirii. Aceasta este trist și inacceptabil pentru un popor cultural".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

DESPRE MENTORI ȘI TINERI

„Rolul profesorului, ctitor de școală, mi se pare asemănător cu rolul părinților în primii ani de viață. Nu cred că trebuie să facă nimic special, ci doar să-și ducă existența firesc și să se lase observat. Rolul principal este să croiască un drum, să vadă ceea ce este important și să ofere tinerilor posibilitatea de a-l urma. De fapt, să ofere o paletă largă de probleme, de întrebări, de șanse dintre care tinerii să-și poată alege ce li se

potrivește, ce le place".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„N. Simionescu și G. Palade au fost modelele după care mi-am format propriul meu mod de a gândi știința. Încerc și eu să fiu un model pentru tineri (fără să dau lecții) și să le arăt prin propria mea existență că le trebuie idei, cutezanță, putere de muncă și încredere pentru a nu dezerta în fața insuccesele inerente cercetării".
(Maya Simionescu, Jurnalul Național - 24 februarie 2009)

DESPRE ȘTIINȚĂ

„Știința în România nu a ajuns la statutul pe care-l merită deoarece sunt unii care din incompetență ignoră știința și pe cei care o slujesc. Mai mult, alții contestă rolul cercetării, și îndeosebi a celei fundamentale în progresul socio-economic, în felul acesta condamnând ceea ce nu înțeleg. De aceea, în aceste vremuri, comunitatea științifică trebuie să iasă din pasivitate și să-și impună punctele de vedere pentru a schimba mentalitatea organelor de decizie".
(Nicolae Simionescu, 1994)

„Democrația nu înseamnă populism și politicianism declarativ. Democrația implică competență, responsabilitate și intelocrație".
(Nicolae Simionescu, 1994)

„Cercetarea este efortul intelectual cel mai creator de care omul este capabil. În istoria omenirii, nevoia de cunoaștere a apărut ca o trăsătură definitorie a ființei umane. În lupta cu natura, omul a trebuit să caute sau să creeze mijloace de adaptare, apărare sau atac. Astfel, cunoașterea din curiozitate a fost ulterior arbitrar definită "cercetare fundamentală", iar cunoașterea generată de nevoia de soluții a fost, într-un sens foarte larg, numită cercetare aplicativă. Această taxonomie este larg criticabilă, iar folosirea acestor termeni operaționali în politica științei a creat și creează încă dificultăți și uneori erori în soluții".
(Nicolae Simionescu, 1984)

„....cercetarea fundamentală în biomedicină are prin obiectul ei - omul - cea mai aplicativă dintre cercetări deoarece se adresează omului ca fiind nu numai pateticul nostru capital, dar neîndoielnic unicul producător al oricărei alte cercetări".
(Nicolae Simionescu, 1984)

„Investiția constantă în științele de bază și în formarea noii generații de scientiști este cea mai lucidă și mai sigură investiție în viitor".
(Nicolae Simionescu, Academica - 1994)
„Generația „biologică" (calendaristică) se dovedește, în unele cazuri, a fi neesențială,

cum este exemplul unor eminenți oameni de știință, ca Prof. Ștefan Milcu sau Prof. G. E. Palade (și exemplele sunt numeroase). Beneficiari ai unei structuri biologice și intelectuale de excepție, prin felul în care gândesc și acționează ei au aparținut și aparțin în continuare generației științifice tinere, de avangardă. Cât de relativ este impactul generației biologice asupra performanțelor profesionale se poate vedea și în strălucitele exemple din alte domenii, ca cele ale artei și culturii (P. Picasso, P. Cassals, A. Rubinstein, A. Horowitz etc.)".
(Nicolae Simionescu, 1994)

„Știința mare este generată de întrebări mari și de setea de răspunsuri la marile întrebări ale cunoașterii, răspunsuri care odată obținute vor genera noi întrebări și mai profunde… Năzuința biologilor celulari spre adevărul științific este o izbândă a adevărului în general de care societatea noastră are atâta nevoie…".
(Nicolae Simionescu)

„…finanțarea corespunzătoare a Cercetării Fundamentale nu apare ca un lux, ci ca cea mai potențial productivă investiție în inteligența românească".
(Nicolae Simionescu)

„...Orice minte informată, știe că nu se poate sconta pe un progres economic fără sprijinirea cercetării fundamentale…".
(Nicolae Simionescu)

„...Știința este parte a culturii, iar ...Cultura înseamnă deopotrivă trei lucruri: creație, asimilare și transmitere de valori".
(Nicolae Simionescu, 1989)

„...să ne aducem aminte de minunații cărturari și oameni de știință ai țării noastre care, în vremuri grele, au știut să găsească resursele spirituale și fizice pentru a crea asociații și societăți științifice și culturale ce au modulat hotărâtor istoria social-politică și culturală a țării".
(Nicolae Simionescu, 1982)

„...să înțelegem obligația ce ne revine de a lăsa generațiilor viitoare un început de drum".
(Nicolae Simionescu, 1982)

„Să vorbim azi de o ecologie a culturii la care avem datoria de a participa activ pentru identificarea și combaterea surselor de poluare și a gravelor efecte pe care le pot avea asupra purității și viabilității moștenirii spirituale pe care o transmitem viitoarelor generații".
(Nicolae Simionescu, 1989)

„De ce sunt atât de importante pentru noi caietele lui Eminescu? Pentru că ele reflectă o imensă sete de cunoaștere pentru tot: filozofie, filologie, economie, istorie, etc… caietele lui conțin zeci de pagini de adnotări de biologie, chimie, fizică, matematică. Comemorându-l pe Eminescu, reiterăm îndemnul, adresat îndeosebi tineretului nostru, pentru încredere în geniul creator al poporului român și năzuința activă spre o formare complexă".
(Nicolae Simionescu, 1989)

DESPRE ACADEMIE

„Academia este o parte și o emanație a cercetării științifice. În primirea de noi membri, Academia Română ar trebui să fie ca Janus, zeul roman patron al tuturor începuturilor dar și al tuturor sfârșiturilor – cu o față să privească înapoi spre creatorii de știință și cultură de ieri, pe care să-i consacre – cu cealaltă față să scruteze înainte pentru a identifica mințile tinere creatoare, capabile să ducă mai departe pe o orbită superioară viitorul acestei Academii".
(Nicolae Simionescu, 1994)

„Viata academică, în general, și a Academiei noastre, în special, este cunoscută și recunoscută de cine vrea să o cunoască, cine se apleacă cu spiritul liber și linistea gândului bun și își ia răgazul să observe. Acești observatori corecți văd că, în condiții deloc simple, în Academia Română de azi, trecutul, prezentul și viitorul culturii noastre (știință și arte) au devenit un proiect central, al cărui obiectiv este restalibirea ordinii firești a valorilor noastre, a bogatului nostru patrimoniu național".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

IMPOSIBILUL NU EXISTĂ

Gânduri de viitor

- Institutul să dăinuie și să continue drumul ascendent început în urmă cu 30 de ani;
- Tinerii cercetători să se lase seduși de farmecul ascuns al cercetării și să se împlinească descoperind secretele naturii cu pasiune, cutezanță, determinare și onestitate.

- ...regret că nu am răgazul și nici talentul să scriu o carte despre „imposibilul nu există".

ACADEMICIAN MAYA SIMIONESCU
Director al Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu"
Co-fondator al Institutului

INSTITUTUL SIMIONESCU

30 ani

... IMPOSIBILUL NU EXISTĂ...

memento

NICOLAE SIMIONESCU

1979-2009

Acest volum de amintiri este publicat cu ocazia celei de-a 30-a aniversări a Institutului de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

editare
ILEANA MÂNDUȚEANU
LOREDAN ȘTEFAN NICULESCU
MAYA SIMIONESCU

viziune grafică şi coperta
OVIDIU CROITORU

arhiva foto
MARILENA DAJU

Tipărit în România la
EDITURA SEMNE

FUNDAȚIA NAȚIONALĂ PENTRU ȘTIINȚE ȘI ARTĂ
ISBN 978-973-1744-75-9

IBPC „NICOLAE SIMIONESCU”
BUCUREȘTI, 2009

2009 ® Maya Simionescu
Toate drepturile rezervate. Nicio parte a acestei publicaţii nu poate reprodusă, arhivată sau transmisă, sub orice formă, electronică, mecanică, fotocopiată, înregistrată sau în alt mod, fără permisiunea scrisă a autorului.

memento
NICOLAE
SIMIONESCU

CUPRINS

11 **LA ÎNCEPUT A FOST IDEEA...VISUL**

15 **OMAGIU PROFESORULUI NICOLAE SIMIONESCU**

15 **GEORGE E. PALADE:** NICOLAE SIMIONESCU - O VIZIUNE EXIGENTĂ, DAR LUMINOASĂ PENTRU VIITORUL ȘTIINȚELOR BIOMEDICALE ÎN ROMÂNIA

24 **GUIDO MAJNO**: ROMÂNIA A PIERDUT PE UNUL DINTRE CEI MAI DISTINȘI FII AI SĂI, DAR S-A ÎMBOGĂȚIT CU O PREȚIOASĂ MOȘTENIRE

27 **MAYA SIMIONESCU:** NICOLAE SIMIONESCU: PRIN PROPRIILE CUVINTE... PRIN CUVINTELE CONTEMPORANILOR ...

45 **NICOLAE CAJAL**: NICOLAE SIMIONESCU EXISTĂ ȘI VA EXISTA ÎNTOTDEAUNA PRIN GÂNDIREA LUI

48 **CONSTANTIN POPA**: ÎNTÂLNIREA MEA CU PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU

55 **CONSTANTIN NEACȘU**: PREGĂTIRI DE LANSARE

58 **DOINA VELICAN**: UN OM, O IDEE – SUSȚINEREA ADEVĂRATELOR VALORI

61 **ANCA SIMA**: PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU – CREATORUL ȘCOLII ROMÂNEȘTI DE BIOLOGIE CELULARĂ ȘI MOLECULARĂ

65 **CONSTANTINA HELTIANU**: 1980 - RECEPTORUL LA HISTAMINĂ, PRIMA VICTORIE, PRIMA CUPĂ DE ȘAMPANIE ÎN IBPC

67 **DOINA POPOV**: DE LA SITUSURI DE LEGARE A ALBUMINEI LA RECEPTORUL PENTRU ALBUMINĂ

70 **FELICIA ANTOHE**: TRANSCITOZA MACROMOLECULELOR PRIN ENDOTELIUL VASCULAR - UN CONCEPT PRELUAT DE COMUNITATEA ȘTIINȚIFICĂ INTERNAȚIONALĂ

73 **VICTOR V. JINGA**: PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU - SCHIȚĂ BIOGRAFICĂ

78 **ALBUM NICOLAE SIMIONESCU**

99 PRELEGERI ALE PROFESORULUI NICOLAE SIMIONESCU
99 MIHAI EMINESCU – UN SECOL DE NEMURIRE
102 THE CELL, A WISDOM IN IDENTITY AND INTEGRATION

111 PROF. NICOLAE SIMIONESCU ÎN INTERVIU CU DOMNUL NICOLAE TZONE

130 POLITICA ȘTIINȚEI ÎN VIZIUNEA ACADEMICIANULUI NICOLAE SIMIONESCU

137 QUO VADIS, ACADEMIA?
PROMOVAREA UNEI POLITICI MODERNE ÎN ABORDAREA CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE ROMÂNEȘTI

151 PRINCIPII GENERALE ALE STRATEGIEI REFORMEI CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE ȘI DEZVOLTĂRII TEHNOLOGICE ÎN ROMÂNIA

162 QUO VADIS, ACADEMIA?
FINANȚAREA COMPETITIVĂ A CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE PRIN GRANTURILE ACADEMIEI ROMÂNE

171 ACTIVITĂȚILE PROFESORULUI NICOLAE SIMIONESCU ÎN ANUL ÎN CARE A FOST VICEPREȘEDINTE AL ACADEMIEI ROMÂNE

175 REVISTE INTERNAȚIONALE:
DESPRE PROF. NICOLAE SIMIONESCU

180 ETAPE ÎN REALIZAREA VISULUI
180 CONCEPȚIA
186 CONSTRUCȚIA

191 AMINTIRI

250 GÂNDURI SCRISE SAU SPUSE
250 DESPRE CELULĂ
250 DESPRE CERCETĂTORI
251 DESPRE CERCETARE
253 DESPRE MENTORI ȘI TINERI
254 DESPRE ȘTIINȚĂ
256 DESPRE ACADEMIE

257 IMPOSIBILUL NU EXISTĂ

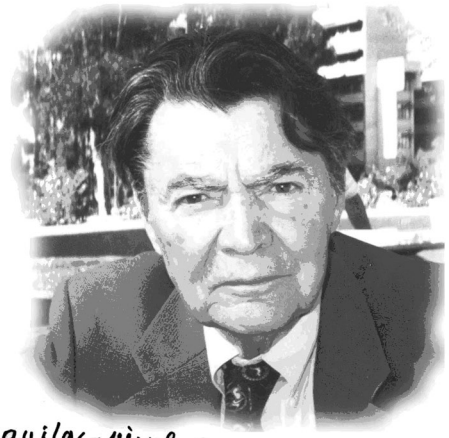
„Cercetarea ştiinţifică este mai mult decât o profesie, este un mod de a trăi, cu strădanii reuşite alături de încercări nereuşite, iar între ele marea agitată a îndoielilor care te invită la înţelepciune”.

„Nu se poate construi nimic durabil, dacă în materialul de construcţie nu este adăugat «quantum satis» - suflet. Fără dăruire nu poţi deveni niciodată ceea ce admiri”.

PROF. NICOLAE SIMIONESCU

LA ÎNCEPUT A FOST IDEEA...VISUL

Cu mult timp înainte de a deveni realitate, în 1971 Nicolae Simionescu și Maya Simionescu au visat la înființarea Institutului.



A început ca un vis -
au trecut ani,
dar - cu trecerea anilor - visul a
prins încet, dar sigur, viață.
Și a deschis într-adevăr
o fereastră spre viitor.
Prin sprijin de sus,
prin eforturile fiecăruia în
colțul laboratorului lui - sau ei -,
Visul trăduș în viață o dă de
transforme sigur în fapte, în
împliniri ce vor încălzi inima
Viitorului.

Sept 8. 79 G. E. Palade

EVOCĂRI ALE CELOR CARE CARE AU VISAT: NICOLAE ȘI MAYA SIMIONESCU

„Ideea (1970) s-a cristalizat într-o perioadă lungă în timpul căreia am avut o extraordinară colaborare de 10 ani cu Profesorul George Palade la Universitățile Rockefeller și Yale din SUA".

„...încă de la bun început ideea noastră de bază a fost pur și simplu să ne formăm acolo și să ne întoarcem în țară și să facem o casă. Sentimentul acesta al instituției a fost foarte puternic la noi și e foarte puternic și acum. Credem, și eu si Maya, în puterea instituțiilor. Trebuie să faci o casă, trebuie să ai o grădină în care să pui un pom. Trebuie să ai o casă ... pe care să o înzestrezi cu tot ce este necesar pentru a putea, în felul acesta, să crești niște oameni în jurul tău. Niste oameni deosebiți. Să faci, ceea ce se spune în termeni mai pedanți, o școală. O școală pe care s-o ridici la rangul de instituție".

„Și, la un moment dat, în 1972, într-o suită de împrejurări care sunt foarte amuzante, m-am așezat, împreună cu Maya, în fața unei hârtii de împachetat și am spus, și unul și altul, în același timp: «Hai să facem un centru modern de biologie celulară, să adunăm niște tineri în jurul nostru, să-i formăm ca un fel de familie și să asigurăm, astfel, o oază de muncă și de liniște și de seriozitate»".

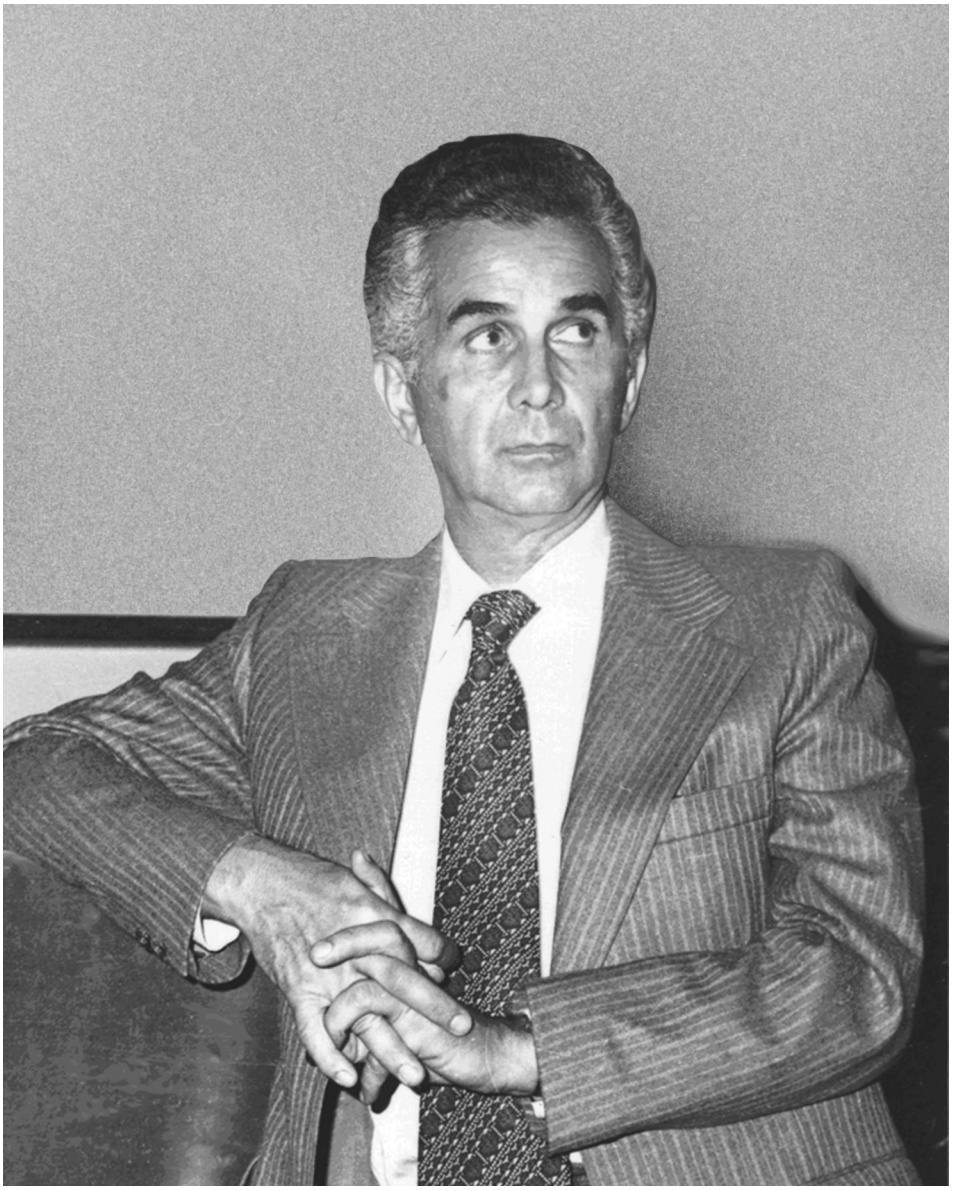
„Dorința noastră a fost să creem un loc unde cercetătorii tineri din România să aibă șansa să își demonstreze talentul și la o scară mai largă, să dezvoltăm biologia celulară la noi în țară".

„Ne-am hotărât să ne concentrăm pe o temă care este științific și socio-economic semnificativă: să descifrăm la nivel celular și molecular funcționarea sistemului cardiovascular în condiții normale și patologice și prin rezultatele noastre să contribuim la combaterea principalei cauze de mortalitate în lume, bolile cardiovasculare".

EVOCAREA CELUI CARE I-A SPRIJINIT PE „VISĂTORI": PROFESORUL GEORGE E. PALADE

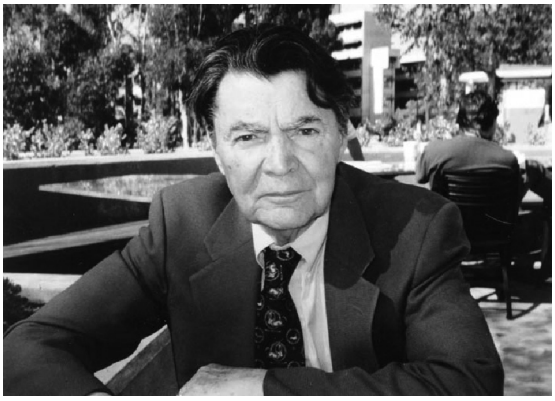
„Între experimente și găsirea unor noi trasori, între sortarea pozelor de microscopie și elaborarea unor lucrări, Nicolae și Maya Simionescu au început să lucreze la planurile unui nou laborator care urma să se construiască în București. Inițiativa a fost în întregime a lor. Rolul meu în această nouă aventură a fost să găsim împreună modalități care să asigure viabilitatea acestui Institut Român. Obiectivul principal era de a se preveni izolarea și de a asigura o colaborare continuă."

OMAGIU PROFESORULUI NICOLAE SIMIONESCU



La 6 februarie 1995,
Profesorul Nicolae Simionescu a trecut din plină activitate în legendă...

NICOLAE SIMIONESCU - O VIZIUNE EXIGENTĂ , DAR LUMINOASĂ PENTRU VIITORUL ȘTIINȚELOR BIOMEDICALE ÎN ROMÂNIA



PROFESOR
GEORGE E. PALADE
Laureat al Premiului Nobel
pentru Medicină
University of California,
San Diego, USA

Evenimentul tragic al sfârșitului neașteptat și prematur al vieții unui om ajuns pe culmile cele mai înalte ale activității sale, crează condițiile ce dezvăluiesc adevărata măsură a valorii sale. Zgomotul de fond ce însoțea activitățile lui zilnice este înlocuit de tăcere, iar relațiile complexe de ambiții și interese comune sau opuse dau loc unui gol pe care se proiectează în lumină puternică și într-un contrast izbitor silueta celui dispărut.

Nicolae Simionescu a murit subit în somn, răpus cu blândețe de boala pentru studiul căreia și-a dedicat o mare parte din viață. El era într-adevăr ajuns pe vârful remarcabilei lui cariere în cercetarea biomedicală. Prin trecerea lui din viață, atât el, cât și comunitatea științifică românească au pierdut realizarea multor idei ce încă germinau în mintea lui. Nu putem măsura pierderile, dar putem evalua realizările avute înainte de plecarea sa bruscă și putem accepta cu respect și venerație moștenirea pe care a lăsat-o comunității românești.

EDUCAȚIA. Nicolae Simionescu a fost produsul sistemului de educație românesc din perioada interbelică. A absolvit Liceul „Sf. Andrei" în 1944 și, în același an, a intrat la Facultatea de Medicină „Carol Davila" a Universității din București, ale cărei cursuri le-a urmat într-o perioadă de rapide și drastice schimbări politice și sociale, cauzate de comunizarea și satelizarea treptată a țării de către politica oarbă și implacabilă a Sovietelor. Mulți români au fost captați de puterea roșie, dar mulți, precum el, au reușit să-și păstreze un „status intern" și o imagine a ceea ce trebuie să facă pentru a nu pierde respectul de sine.

ÎNCEPUTURILE ACTIVIȚĂTII DE CERCETARE.

Încă de pe băncile facultății, Nicolae Simionescu a lucrat ca intern/rezident în chirurgie, iar, după absolvire, ca preparator la Clinica de Chirurgie a Prof. Dr. Ion Juvara. Judecând după viile lui amintiri legate de muncă, aventurile și poznele din această clinică, e cert, că a avut o perioadă de activitate minunată în acel serviciu. În aceeași perioadă lucra și la Catedra de Anatomie, ca preparator apoi ca asistent universitar și aici, animat de curiozitatea înnăscută a omului de știință în devenire, a studiat și prezentat o serie de particularități în organizarea vasculaturii unor organe ca splina, rinichiul și pancreasul.

În 1957, s-a mutat de la chirurgie la Institutul de Endocrinologie - condus la vremea aceea de Ștefan Milcu - ca cercetător principal și conducător al Secției de Morfologie. În perioada aceea, curiozitatea lui înnăscută, s-a concentrat pe câteva subiecte bine alese, iar rezultatul s-a concretizat într-o serie de lucrări importante asupra glandei suprarenale și o monografie publicată în Anglia asupra morfologiei normale și patologice a glandei tiroide. La Institutul de Endocrinologie, Nicolae Simionescu a întâlnit-o pe Maya, o remarcabilă tânără cercetătoare de sine stătătoare, care a devenit colaboratoarea lui constantă și, mai târziu, soția lui.

În 1966, după mai mult de 20 de ani de la plecarea mea din România, m-am întors în țara mea de origine, ca membru al unei delegații a Academiei Naționale de Științe a Statelor Unite pentru a negocia o înțelegere de schimburi științifice cu Academia Română. În acea perioadă, guvernul comunist al României încerca să obțină o margine de independență față de Uniunea Sovietică prin deschiderea unor ferestre către vest. Viața era încă grea în România, dar cel puțin era evident la orice nivel, de la oficialitățile guvernamentale la profesori universitari și până la cetățenii de rând, că românii erau hotărâți să-și afirme și să-și apere identitatea națională și erau pregătiți să recunoască existența unor gradiente economice și științifice și să încerce să stabilească contacte cu restul lumii dincolo de considerațiile doctrinelor politice.

PERIOADA ROCKEFELLER. Am socotit că laboratorul nostru la Universitatea Rockefeller ar putea încuraja această „deschidere către vest" și am hotărât să invit un cercetător român tânăr să lucreze în grupul nostru, la New York. Îl cunoșteam pe Nicolae Simionescu din perioada studenției și i-am cerut sfatul vechiului meu prieten și coleg de clasă, Ion (Cuti) Juvara și răspunsul lui fiind entuziast, l-am invitat pe Nicolae Simionescu să vină la Universitatea Rockefeller. El a acceptat fără întârziere, cu toate că postul pe care-l puteam oferi - asistent de cercetare - era cu câteva trepte sub poziția de conferențiar pe care o avea la București.

În perioada aceea, laboratorul de Biologie Celulară al Universității Rockefeller era la apogeul activității lui, care începuse spre sfârșitul decadei 1940 și a progresat în mod impresionant în decadele următoare. În acel laborator, care a fost recent descris ca „leagănul biologiei celulare moderne", Nicolae Simionescu s-a alăturat generației lui Gunter Blobel, David Sabatini, Marilyn Farquhar și James Jamieson, actualii conducători ai biologiei celulare americane. El li s-a alăturat cu ușurință și grație, chiar dacă

majoritatea noilor săi colegi aveau dificultăți la pronunțarea numelui. Adeseori suna mai mult ca Simonoseki decât Simionescu.

STUDIUL ENDOTELIULUI CONTINUU. Împreună am decis să studiem organizarea și funcțiile endoteliului vascular, în mod deosebit a endoteliului continuu din musculatura corpului, din inimă și plămâni. Rezultatele anterioare ale laboratorului duseseră la descoperirea unor noi structuri denumite vezicule plasmalemale, iar studiile efectuate în anii 1960 sugeraseră implicarea lor în transportul macromoleculelor (feritină) prin stratul endotelial al peretelui vascular. Dar multe rămăseseră de făcut pentru a defini în detaliu, structura capilarelor sanguine și a altor segmente ale microvasculaturii și pentru a cerceta mai departe, funcția veziculelor plasmalemale. Acest domeniu a devenit feuda științifică a lui Nicolae Simionescu. Lucrul a demarat prompt și a progresat repede, dar exista totuși un element care afecta dureros situația general: Maya Simionescu era încă în București. O serie de cereri insistente au reușit, în final, să o aducă la Universitatea Rockefeller, fapt ce a însemnat încă un asistent de cercetare român și un progres mai rapid al proiectului nostru. De asemenea, a însemnat fericire.

Nicolae și Maya Simionescu s-au instalat în campusul Universității și munceau în mod febril zi și noapte (sau cel puțin până seara târziu) pentru a face față competiței formidabile din domeniul nostru de cercetare. Pe de-o parte, specialiștii în fiziologia capilarelor care dominau intelectual scena - pretindeau că toate schimburile transcapilare aveau loc prin pori situați de-a lungul joncțiunilor intercelulare și considerau alternativa transportului prin vezicule plasmalemale ca foarte puțin probabilă, dacă nu chiar imposibilă. Pe de-altă parte uneltele de lucru și procedurile experimentale existente la acea vreme, nu erau suficient de rafinate pentru a produce rezultate acceptate și convingătoare pentru biologii celulari. Nicolae Simionescu a utilizat o serie de trasori de diferite dimensiuni, toți fiind selectați pentru detecția porilor mici, postulați de specialiștii în fiziologia capilarelor, deoarece, acești pori erau în acea perioadă, principalul obiect de interes. Fundamentarea studiilor era clară și adeseori elegantă, dar competiția a rămas neconvinsă.

DESCOPERIREA CANALELOR TRANSENDOTELIALE. Studiile efectuate în acea perioadă au produs totuși un rezultat satisfăcător, important: descoperirea canalelor transendoteliale formate de vezicule plasmalemale fuzionate simultan cu ambele fețe (luminale și abluminale) ale plasmalemei endoteliale. Existența acestor canale a fost stabilită în mod convingător de Nicolae Simionescu. De asemenea, importante au fost studiile lui, în care a identificat segmentele diferențiate ale microvasculaturii din diafragm și a descoperit joncțiuni deschise focale în endoteliul venulelor postcapilare.

PERIOADA YALE. În 1973 grupul nostru, inclusiv Nicolae și Maya Simionescu, s-a mutat de la Rockefeller la Yale Medical School unde a pus bazele

unei noi Secții de Biologie Celulară. Studiile asupra vaselor sanguine au continuat fără întrerupere în aceste noi laboratoare. Lucrările lui Nicolae Simionescu s-au focalizat clar pe endoteliul vascular dar, așa cum era de așteptat din partea unui om de știință, cu adevărat plin de resurse, cercetările lui au acoperit un spectru larg de teme, începând de la tehnici noi de fixare a țesuturilor și mordansare (cu galoilglucoză) pentru obținerea unui contrast optim, la noi trasori (particule de dextran și glicogen), la încercări reușite de a izola microvasculatura din miocard și mergând până la noi tehnici de studiu a joncțiunilor intercelulare (replici de specimene obținute din înghețare-fracturare). Toate aceste studii experimentale au fost efectuate în colaborare cu Maya Simionescu care adeseori a fost prim-autor.

La acea vreme, Nicolae și Maya erau deja recunoscuți ca biologi celulari de frunte specializați în studiul endoteliului vascular și în această calitate reprezentau laboratorul nostru la diferite conferințe și întâlniri în Mexic și Japonia.

Ceea ce era remarcabil este faptul că de îndată ce schițam un domeniu de cercetare, studiile erau rapid și eficient realizate și extinse până la limita permisă de tehnologia zilei. Așa s-a întâmplat în cazul joncțiunilor endoteliale și al câmpurilor vasculare bipolare în diafragm. Și tot așa s-a întâmplat câțiva ani mai târziu când au fost descoperite microdomeniile diferențiate ale plasmalemei endoteliale.

UN NOU INSTITUT ÎN BUCUREȘTI. După mutarea la Yale, o altă preocupare majoră a intrat în viața lui Nicolae Simionescu fiindcă el socotea că un Institut de Biologie și Patologie Celulară trebuie realizat și poate fi realizat la București. Modelele lui au fost cele două laboratoare de biologie celulară în care a lucrat în Statele Unite (Universitățile Rockeffeler și Yale) și Institutul Internațional de Biologie și Patologie Celulară fondat de Christian de Duve în Belgia. Astfel, printre experimente, descoperiri de noi trasori, selecționări de microfotografii și redactări de manuscrise, Nicolae Simionescu a început să lucreze la planurile unui nou laborator care urma să fie construit în București. Inițiativa i-a aparținut în întregime. Rolul meu în aceast nou proiect a fost de a găsi, împreună cu el, căile și mecanismele care să asigure viabilitatea acestui institut în România. De la început a fost nevoie de o legătură oficială cu o universitate americană. Yale Medical School a devenit partenerul american, iar Universitatea din București cel român. Apoi a fost necesară realizarea și semnarea unei convenții oficiale între cei doi parteneri. Obiectivul principal era prevenirea izolării și asigurarea unei colaborări continui. Convenția prevedea ca Nicolae și Maya Simionescu să funcționeze anual câte trei luni la Yale, participand la activitați didactice și de cercetare, și nouă luni la București la noul institut. Planurile au fost definitivate, convenția a fost semnată și institutul a fost construit, bine echipat și inaugurat în 1979. Mai mult decât atât, folosindu-și bine noile relații științifice din Statele Unite și profitând de disponibilitatea Burselor Fullbright, Nicolae Simionescu trimisese deja un prim grup de tineri români, bărbați și femei, pentru a se perfecționa în laboratoare de frunte în străinătate în domenii alese cu multă atenție. Ei s-au întors la București gata pentru începerea activității în propriul lor Institut.

MICRODOMENII DIFERENȚIATE. În primii ani lucrurile păreau să meargă fără dificultăți. Nicolae și Maya au organizat o excelentă echipă de lucru în România, și au putut să sosească la timp la Yale pentru a-și îndeplini obligațiile ca profesori asociați (visiting professors). Amândoi s-au dovedit a fi excelenți dascăli, atât în laborator, cât și în sălile de curs. Mai mult decât atât, studiile experimentale la Yale s-au îndreptat în direcții noi, interesante și promițătoare. Au fost descoperite microdomenii diferențiate pe aspectul luminal și abluminal al plasmalemei endoteliului fenestrat și continuu, folosind ca probe, feritina cationizată și diferite lectine, și parte din moleculele implicate în aceste diferențieri au fost identificate în urma tratamentelor cu enzime specifice. Elementul cel mai important în aceste noi descoperiri a fost faptul că aceste microdomenii diferentiate chimic, corespundeau unor elemente structurale bine definite. Mai mult, rezultatele au sugerat clar că veziculele plasmalemale au compoziția chimică de suprafață necesară pentru a transporta proteine plasmatice, cunoscute ca fiind în majoritatea lor specii de tip anionic.

Proiectul privind domeniile microdiferențiate a fost un alt exemplu de activitate dusă la bun sfârșit prompt și cu mare eficiență de către Nicolae și Maya Simionescu. La Universitatea Yale și la IBPC proiectul acesta a fost aprofundat și extins și la alte tipuri de endotelii. Același protocol de bază a fost aplicat pentru localizarea receptorilor pentru histamină pe suprafața endotelială, folosind conjugate de histamină-feritină.

NOI TRASORI. Ambele laboratoare au dezvoltat apoi o nouă direcție de cercetare, derivată în parte din studiul microdomeniilor diferențiate și bazată pe ipoteza că proteinele plasmatice ar putea constitui trasori mai potriviți decât peroxidazele (folosite la acea vreme) pentru a demonstra în continuare rolul veziculelor plasmalemale în schimburile dintre plasmă și fluidele interstițiale. Erau necesare, însă, noi metode pentru a evidenția acești trasori mai puțin problematici și mai fiziologici. Primul pas important făcut la IBPC a fost localizarea preluării lipoproteinelor de joasă densitate de către veziculele plasmalemale ale endoteliului vaselor mari ca și de acela din vasa vasorum. Descoperirea a reprezentat o deschidere nouă spre vastul domeniu al aterosclerozei și bolilor cardiovasculare, domeniu care a devenit în anii următori scopul major al eforturilor de cercetare din Institutul de Biologie și Patologie Celulară.

Al doilea pas important a fost întroducerea complexelor de aur coloidal-albumină ca trasori care puteau fi identificați individual în specimene microvasculare, bine prezervate morfologic. Activitatea aceasta s-a desfășurat în paralel la Yale și la IBPC, dar Nicolae și Maya Simionescu susținuți de colaboratori competenți, au avansat mai repede și au diversificat investigațiile incluzând, în afara albuminei simple, albumina glicată și complexele de albumină-acizi grași în repertoriul proteinelor folosite pentru conjugare cu particule de aur coloidal. De data aceasta, rezultatele erau deasupra oricăror dubii. Toți acești trasori erau preluați de către veziculele plasmalemale și descărcați de ele, pe partea opusă a endoteliului printr-un proces pentru care Nicolae Simionescu introdusese deja termenul de transcitoză.

Validitatea vechii ipoteze, a transportului prin vezicule plasmalemale a fost în mod convingător stabilită de noile rezultate, dar aspecte importante deși subsidiare rămăseseră fără răspuns. Toate complexele albumină-aur reprezentau probe exclusive pentru ipoteticul sistem al porilor mari: din punct de vedere fiziologic sistemul porilor mici era mai important. Mai mult, complexele reprezentau probe experimentale și interacția lor cu endoteliul nu era în mod necesar aplicabilă și albuminei monomerice. Acestei probleme i s-a dat în final un răspuns în laboratorul de la Yale, unde s-a demonstrat (imunocitochimic, folosind complexe aur-anticorpi pe secțiuni fine la gheață din inima de șoarece) că veziculele plasmalemale sunt clar implicate în transcitoza albuminei monomerice native.

Rezultatele obținute cu trasorii albumină-aur l-au îndemnat pe Nicolae Simionescu să postuleze existența unor proteine de legare a albuminei la nivelul plasmalemei endoteliale, posibil implicate în transcitoză. Cercetările ulterioare din IBPC au identificat de fapt patru proteine, dar deoarece ele au fost găsite de asemeni, în multe alte tipuri celulare, altele decât cele endoteliale, rolul lor funcțional urmează a fi elucidat, prin noi cercetări experimentale.

RECUNOAȘTEREA MONDIALĂ. În decada 1980, Nicolae și Maya Simionescu au ajuns să fie recunoscuți pe plan mondial, ca lideri în cercetarea endoteliului vascular și IBPC a ajuns să fie unanim considerat, ca un important centru de avangardă în acest domeniu. Ambele poziții au fost consolidate în continuare de cercetările modificărilor incipiente care afectează peretele vaselor mari, susceptibile de a dezvolta leziuni ateromatoase. Recunoașterea largă s-a materializat în invitații ca profesori asociați (visiting professors) la Universitățile McGill, Columbia și la Universitatea din California la Los Angeles, și de asemenea în invitații de a participa practic vorbind la toate conferințele asupra endoteliului organizate pe ambele maluri ale oceanelor Pacific sau Atlantic.

În termeni practici însă, cel mai important semn al recunoașterii mondiale, au fost cele trei granturi (timp total de 9 ani) acordate de NIH, pentru IBPC, la solicitarea lui Nicolae Simionescu. Au fost primele și singurele granturi acordate unui institut de cercetare din Europa de Est, într-o perioadă în care granturile acordate unor institute din afara SUA reprezentau doar un foarte mic procent din total. Aceste granturi au făcut posibilă achiziționarea de chimicale și echipamente de pe piața vestică și organizarea de simpozioane internaționale la IBPC pe teme de interes general în biologia endoteliului, inclusiv transcitoza proteinelor și lipoproteinelor și rolul lor în dezvoltarea leziunilor aterosclerotice. La aceste conferințe au participat cercetători americani de înalt prestigiu din fiecare domeniu menționat mai sus, în acele vremuri, conferințele acestea erau printre puținele ocazii în care tinerii cercetători români din IBPC și alte instituții au avut posibilitatea de a se întâlni cu „nume" de care aflaseră în revistele științifice și de a purta discuții cu ei.

La sfârșitul decadei 1980, dificultăți diferite au început să-și facă apariția la orizont. Întâi, autoritățile române au devenit din ce în ce mai reticente în acordarea

vizelor de ieşire din ţară pentru Nicolae şi Maya Simionescu. Noi nu mai puteam conta pe sosirea lor la timp pentru perioada celor trei luni la Yale. Apoi facilităţile şi personalul nostru tehnic de la Yale nu mai erau pe măsura celor de care Nicolae şi Maya dispuneau la IBPC. În fine, tinerii membri ai laboratoarelor începuseră să piardă din vedere raţiunile acordurilor iniţiale. IBPC nu mai era considerat ca un institut în dezvoltare, ci ca un competitor matur şi eficient. Ceea ce însemna, de fapt, că experimentul iniţial şi cel mai important, care fusese crearea IBPC-ului, reuşise pe deplin. În final, guvernul român a refuzat prelungirea convenţiei de colaborare.

CONTRIBUŢII GENERALE LA LITERATURA ŞTIINŢIFICĂ. Nicolae Simionescu iubea activitatea de dascăl şi avea un dar deosebit de a organiza şi sistematiza informaţia ştiinţifică. Acest talent l-a folosit cu succes la redactarea împreună cu Maya Simionescu a unor capitole din tratate americane de histologie, a unor lucrări de sinteză asupra organizării şi funcţionării endoteliului şi de asemenea la editarea a două volume succesive, deosebit de utililizate, asupra funcţiilor normale şi disfuncţiilor celulei endoteliale.

CERCETAREA ÎN ATEROSCLEROZĂ. În prima parte a anilor 80, Nicolae Simionescu a iniţiat în IBPC, o direcţie de cercetare cu totul nouă, ca răspuns la importantele descoperiri rezultate în studiul particulelor lipoproteice şi dezvoltării leziunilor aterosclerotice, făcute în alte laboratoare. Undeva în adâncurile spiritului lui, exista un profund şi constant interes pentru patologia experimentală care acum ieşea la suprafaţă cu o forţă suficient de puternică pentru a deveni una din liniile dominante de cercetare în IBPC.

Această nouă direcţie de cercetare a produs un nou model experimental, hamsterul cu leziuni ateromatoase induse printr-o dietă bogată în lipide şi colesterol. S-a concentrat asupra modificărilor incipiente care preced leziunile ateromatoase observabile: a demonstrat că hipercolesterolemia determină modificări în chimia suprafaţei endoteliului şi a intimei arterelor susceptibile la ateroscleroză şi de asemenea a evidenţiat că lipoproteinele, apolipoproteinele şi liposomii (descoperite la IBPC) se acumulează în matricea extracelulară a intimei. Aceşti liposomi (lipoproteine modificate) au fost izolaţi şi parţial caracterizaţi. Prezenţa lor a fost iniţial o surpriză în patologia vasculară, dar mai târziu liposomii extracelulari au fost detectaţi şi de alte grupuri implicate în cercetarea aterosclerozei experimentale.

LA COLUMBIA COLLEGE OF PHYSICIANS AND SURGEONS. La începutul anilor ‘90, Nicolae şi Maya Simionescu, menţinând legătura lor cu Universitatea Yale, au iniţiat o colaborare sustinută cu cercetători (S. Silverstein şi D. Stern) din Departamentul de Fiziologie al Universităţii Columbia. Parte din activitate s-a concentrat în continuare asupra modificărilor endoteliale din ateroscleroza incipientă şi asupra localizării receptorilor endoteliali pentru produşii de glicare avansată a proteinelor sanguine, un aspect de o deosebită importanţă în complicaţiile

cardiovasculare ale diabetului. O altă parte a acestei activități a fost realizarea unei proceduri reușite, ingenioase și interesante de radioiodinare a proteinelor veziculelor plasmalemale folosind complexe aur-albumină suplimentate cu lactoperoxidază urmată de substanțele cerute pentru radioiodinare. Metoda este de mare actualitate, dată fiind intensitatea interesului actual în biochimia caveolelor (o altă denumire dată veziculele plasmalemale).

IBPC DUPĂ 1989. Căderea regimului comunist la sfârșitul anului 1989 a permis ca numeroase idei, dorințe și inițiative îndelung supresate, să răbufnească la suprafață ca parte a unui sindrom general de decomprimare. La IBPC rezultatul a fost că mulți dintre tinerii cercetători au plecat în căutarea unor noi posibilitați de afirmare în străinătate, în Franța, Germania, Anglia și Statele Unite. Majoritatea prestează o activitate de înaltă calitate și găsesc poziții bune în cercetarea științifică, mulțumită experienței dobândite în IBPC alături de Nicolae și Maya Simionescu. În același timp IBPC a reușit deja, să recruteze și să pregătească o nouă generație care promite să fie la fel de bună, dacă nu chiar mai bună decât prima.

ACADEMIA ROMÂNĂ. În 1990 Nicolae și Maya Simionescu au fost aleși membri corespondenți ai Academiei Române. In 1991 au devenit membri plini și în 1994, Nicolae Simionescu a fost ales Vice-Președinte al Academiei Române. A acceptat aceste noi responsabilități cu sentimentul că are misiunea de a îmbunătăți condițiile și nivelul de suport al cercetării fundamentale și aplicate în științele biomedicale din România. A considerat că ceea ce este valabil și reușit în organizarea sistemului de cercetare științifică din țările vestice, trebuie avut în vedere și, dacă este posibil, adaptat necesităților comunității științifice românești și de asemeni, realităților economice din România. Anul trecut Academia a inițiat primul sistem de granturi competitive pentru cercetare. A fost primul pas pe care Nicolae Simionescu și noua conducere a Academiei Române l-au făcut în direcția unui viitor mai luminos.

ÎN LOC DE CONCLUZII. Nicolae Simionescu a avut o carieră meteorică. În zece ani, pornind cu o inteligență sclipitoare și o educație generală valoroasă a devenit o autoritate deplină și unanim recunoscută în biologia celulară a endoteliului vascular. In decada următoare și în continuare, în condiții sociale și politice nesigure și dificile, a organizat un institut de cercetare și a pregătit o întreaga echipă de cercetători capabili, iar în următorii cinci ani și-a asumat o poziție de conducere în Academia Română, cea mai înaltă instituție care ghidează activitatea de creație a țării. În fiecare etapă în această rapidă evoluție, a lăsat în urmă o moștenire durabilă: realizările cercetărilor lui științifice, Institutul de Biologie și Patologie Celulară - două generații de cercetători bine pregătiți - și o exigentă dar luminoasă viziune asupra viitorului științelor biologice și biomedicale în România.

ROMÂNIA A PIERDUT PE UNUL DINTRE CEI MAI DISTINȘI FII AI SĂI, DAR S-A ÎMBOGĂȚIT CU O PREȚIOASĂ MOȘTENIRE

PROFESOR GUIDO MAJNO
University of Massachusetts, Worcester, USA

Îmi vine greu să cred că mă aflu în situația de a-mi așterne în scris gândurile pentru comemorarea lui Nicolae Simionescu. Ce pierdere teribilă pentru România, pentru știință, pentru nedespărțita sa Maya, și pentru acei nenumărați dintre noi care l-au iubit și admirat! Nu mi-aș fi putut închipui vreodată că poate exista o lume fără el, în așa mare măsură a făcut parte din viețile noastre, fiind atât de necesar pentru mulți dintre noi. A fost o personalitate unică în multe privințe. Pentru soția și colaboratoarea mea Dr. Isabelle Joris și pentru mine, întâlnirile noastre anuale cu familia Simionescu, de obicei în Statele Unite, deveniseră un ritual pe care-l anticipam cu mare bucurie și nerăbdare, ca pe o transfuzie de idei și o posibilitate de a face o incursiune imaginară în știința viitorului. Nimic nu va putea înlocui aceste ocazii.

Încercând să-mi transpun durerea în vorbe, un cuvânt îmi izvorăște în minte: Eroism. Nicolae Simionescu ne-a lăsat un minunat exemplu de eroism în viața publică și particulară. Nicolae și Maya ar fi putut beneficia de oricare dintre confortabilele poziții academice din Statele Unite, dar ei au ales calea cea mai dificilă, cea de a-și ajuta propria țară (și iată că din nou mă surprind vorbind de Nicolae și Maya împreună, căci într-adevăr ei formau o unitate).

Nicolae a fost un cetățean al planetei, dar el a fost în primul rând Român prin toată ființa sa, până la ultima sa celulă. Și-a consacrat întreaga energie edificării in România a unei insule de excelență - la nivel mondial - și a realizat aceasta în ciuda unor enorme dificultăți, suferințe și chiar pericole personale. Protejat de extraordinara sa prestanță, de statura lui științifică și de inspirata sa imaginație, s-a luptat pentru viitorul tinerilor români zi de zi, asumându-și personal riscuri.

Din punct de vedere științific formația sa a fost unică, combinând medicina

experimentală, endocrinologia, chirurgia cu anatomopatologia de diagnostic, discipline pe care le-a practicat la Institutul de Endocrinologie din București, timp de 18 ani, urmați apoi de alți zece ani de pregătire în laboratorul unuia dintre fondatorii biologiei celulare, laureatul Premiului Nobel, George E. Palade. S-a îndrăgostit - ca de altfel atâția alții înainte și după el -, de celulele care căptușesc vasele sanguine și ne separă de „oceanul nostru interior", celulele endoteliale.

Apoi, în 1979, s-a întors la București, pentru a conduce un nou institut pe care l-a plănuit cu grijă și l-a desemnat a fi un nou „paradis" al biologiei celulare. Credincios dublei sale formații de Doctor în Medicină și de Doctor în Științe, l-a denumit Institutul de Biologie și Patologie Celulară, singurul institut cu această titulatură existent, după câte știu, în lumea întreagă. Trebuie să fi fost o experiență inspirată, cea de a da o orientare unei echipe formate din 86 oameni, dintre care 19 foarte tineri și însetați de cunoaștere, dar relativ ne-experimentați cercetători. Acesta a fost doar începutul.

Foarte curând grupul s-a extins la 130 membri, selecționați în urma discuțiilor purtate cu peste 1300 de candidați. Cu 30 de ani în urmă, un alt mare cercetător, Peter Medawar, a denumit știința ca „artă a soluțiilor", înțelegând prin aceasta faptul că etapa esențială în practicarea științei este talentul de a aborda doar acea problemă care este rezolvabilă cu mijloacele accesibile. Nicolae Simionescu a procedat întocmai și a ales să concentreze activitatea întregului institut asupra unei singure probleme: biopatologia celulară și moleculară a sistemului cardiovascular, și în particular a endoteliului și a rolului lui esențial în patologie, anume ateroscleroza. A fost o alegere inspirată; nicăieri în lume nu mai există un grup atât de puternic capabil să abordeze ateroscleroza din atâtea puncte de vedere ale biologiei celulare, incluzând biochimia, biofizica, fiziologia, patologia, culturile de țesuturi și microscopia electronică.

Timpul a dovedit că Nicolae Simionescu a ales soluția cea bună (chiar dacă a trebuit să se lupte cu foarte mari dificultăți, cum ar fi instabilitatea tensiunii electrice, fapt care a făcut ca microscopia electronică să fie impracticabilă o perioadă destul de lungă). Curând institutul a produs rezultate științifice care au avut rezonanță în întreaga comunitate științifică și în orice discuție despre ateroscleroză, vase sanguine și endoteliu, nimeni nu se putea considera informat la zi, fără a fi la curent cu ultimele descoperiri ale lui Nicolae și Maya Simionescu și a colectivului lor.

Printre realizările științifice ale lui Nicolae Simionescu și ale perseverentei sale echipe, voi menționa doar câteva pe care le găsesc deosebit de importante:
(a) demonstrarea definitivă, împreună cu G.E. Palade, a faptului că permeabilitatea endotelială variază atât de-a lungul întregului arbore vascular precum și la nivelul unei singure celule endoteliale;

(b) evidențierea faptului că celula endotelială prezintă receptori pentru albumină pe care aceasta îi folosește în transportul transendotelial al acestei proteine, o descoperire care a fost considerată ca cea mai importantă contribuție adusă fiziologiei endoteliului de la descoperirea legii lui Starling, sau mai bine spus de când George Palade a demonstrat existența transportului vezicular;
(c) demonstrarea faptului că receptorii pentru histamină sunt concentrați în special în venule - spre deosebire de arteriole și capilare - explicând topografia predominant venulară a creșterii permeabilității vasculare în inflamație, un fenomen care i-a intrigat pe patologi aproape un secol;
(d) descoperirea faptului că primul fenomen demonstrabil în ateroscleroză este „pomparea" lipidelor de către endoteliu în spațiul subendotelial, observație care a fost publicată în revista American Journal of Pathology și a oferit o perspectivă cu totul nouă în modul nostru de a privi ateroscleroza;
(e) introducerea denumirii de transcitoză, a fost o idee genială. Conceptul de transport transendotelial prin vezicule plasmalemale a fost propus de către George Palade cu 30 de ani urmă, dar din motive greu de înțeles a întâmpinat o rezistență considerabilă. Nicolae Simionescu i-a atribuit o denumire care, relevând semnificația generală, a determinat ca aproape imediat fenomenul să fie acceptat ca o realitate. Legat de acesta, conceptul de transcitoză mediată de receptori a fost introdus de către Nicolae Simionescu;
(f) monografiile asupra endoteliului normal și patologic editate de Maya și Nicolae Simionescu au devenit referințe bibliografice de bază în literatura de specialitate internațională.

Contemplând asupra dimensiunii acestei pierderi pentru noi, singurul gând, singura consolare la care mă pot gândi - și este una puternică, rămâne faptul că Nicolae a îmbogățit în permanență viețile noastre. Cei ce au avut privilegiul de a-l cunoaște personal, vor păstra printre amintirile lor cele mai dragi, sclipirile imbatabilului său simț al umorului, care nu l-a părăsit nici chiar în cele mai dificile momente. Deși pentru comunitatea științifică internațională, el a reprezentat chintesența cercetătorului autentic, în viața sa particulară a găsit timpul necesar să compună muzică la pian, să picteze și să scrie poezii, fiind și în aceste domenii un admirabil model pentru mai tinerii săi colaboratori.

Printre darurile concrete, Nicolae Simionescu ne-a lăsat un monument viu, Institutul de Biologie și Patologie Celulară, un institut cu o denumire și o misiune științifică frumoasă. Și mai presus de toate, pentru români și pentru cercetătorii din întreaga lume exemplul său de curaj lipsit de compromisuri va continua să dăinuie, căci avem nevoie de eroi mai mult ca oricând în aceste timpuri dificile în care trăim.

Prin dispariția sa, România a pierdut pe unul dintre cei mai distinși fii ai săi, dar în același timp s-a îmbogățit cu o valoroasă moștenire.

NICOLAE SIMIONESCU:
PRIN PROPRIILE CUVINTE... PRIN CUVINTELE CONTEMPORANILOR ...

ACADEMICIAN MAYA SIMIONESCU
Institutul de Biologie și Patologie Celulară
"Nicolae Simionescu"

Încercând să creionez un portret al Profesorului Nicolae Simionescu m-am uitat, firește, în ultimul său Curriculum Vitae și mi-am dat seama cât de puțin spune acesta despre profilul moral și intelectual al unui om atât de complex. Dar ce stă scris, de fapt, în acest Curriculum Vitae? O prodigioasă carieră științifică, cu peste 600 de lucrări publicate (despre care el însuși spunea, cu modestie, „numeric valoric nesemnificativ"), zeci de cărți, tratate, monografii, descoperiri, premii și distincții – numeroase citări în literatura de specialitate. Dar ce nu scrie în acest C.V.? Nu scrie cine era de fapt Omul – Nicolae Simionescu, cel ce era făptuitorul a tot ceea ce era scris. Mie îmi este greu să cuprind în vorbe ce a însemnat Profesorul Nicolae Simionescu. Dar, m-am gândit să îl prezint chiar prin vorbele lui, deși, nici asta nu este ușor, căci, despre el, nu vorbea aproape deloc, nu a apărut niciodată la televizor sau în ziare. La insistențele Domnilor Ioan Longin Popescu și Nicolae Țone, a dat două interviuri, pentru a-l evoca pe Prof. Palade. Ne împărtășea însă, o parte din gândurile lui, la Sesiunile Anuale ale Institutului nostru și ale Societății Naționale de Biologie Celulară, în timpurile grele dinainte de 1989 și după.

Din ceea ce am spicuit din cuvintele sale așternute pe hârtie in diverse ocazii, din luările de cuvânt, precum și din unele date personale la care m-am oprit și pe care vi le voi mărturisi, am să încerc să creionez profilul moral al Profesorului nostru, astfel:

1. Nicolae Simionescu - Omul;
2. Ctitorul Institutului de Biologie și Patologogie Celulară;
3. Creator al școlii naționale de biologie celulară;
4. Cercetătorul și profesorul;
5. Membru și Vicepresedinte al Academiei Române;
6. Nicolae Simionescu: romanticul... gânditor...

1. NICOLAE SIMIONESCU - OMUL

Între 1937-1944 Nicolae Simionescu este elev la Liceul „Dimitrie Cantemir"; bacalaureatul îl ia la Liceul „Sf.Andrei". Este un elev sârguincios, anual premiant.

În 1945 intră la Facultatea de Medicină. După primul an, în urma examenului de anatomie, susținut cu marele anatomist, Profesorul Gr.T. Popa, acesta (cu anticipația caracteristică spiritelor de excepție) îl remarcă și îl reține la catedră. Nicolae Simionescu a avut impresia că nu a știut foarte bine la examen, iar la sfârșit Prof. Gr.T. Popa i-ar fi spus: „dumneata rămâi". I-a fost teamă că asta însemna „dumneata pierzi examenul". Din contră, a însemnat, „dumneata rămâi la catedră". Este student, dar în același timp preparator benevol, apoi preparator la catedra de anatomie, catedră pe care nu o mai părăsește, în fapt, timp de 20 de ani. Când, în 1950, termină facultatea cu diplomă de merit, devine asistent, apoi șef de lucrări și în 1962 conferențiar onorific – tot la anatomie.

La terminarea facultății, prestigiosul chirurg Profesorul Ion Juvara îl invită să lucreze la el, în Clinica de Chirurgie. Acceptă, dar nu renunță la munca didactică. Lucrează simultan, la catedra de anatomie și la Profesorul Juvara, pe care tânărul doctor Simionescu îl admira în mod deosebit, profesional și uman. S-au legat printr-o relație profundă, pe toate planurile, s-au admirat reciproc și au rămas prieteni pe viață.

Dar Nicolae Simionescu dorea, mai mult decât orice, să facă cercetare. Spre uimirea tuturor, după 5 ani, renunță la chirurgie și cere să lucreze in cercetare la Institutul de Endocrinologie. Profesorul Milcu evocă momentul întâlnirii astfel:

„Un tânăr, cu o prezență de o evidentă maturitate, îmi cere să lucreze în cercetare, renunțând la o situație cu posibilități mult mai mari, pentru a se lansa în aventura cercetării științifice, amenințată de numeroase incertitudini".

Devine cercetător și anatomo-patolog la Institutul de Endocri¬nologie unde începe o colaborare de lungă durată și deosebit de fructuoasă cu Prof. Milcu. Acesta îl propune anual la specializări în străinătate. Anual este tăiat de pe toate listele.

În 1969, o invitație total neașteptată sosește de la Prof. George Palade din SUA. Cu dificultate, i se dă aprobarea să plece; se alătură echipei Prof. Palade – 4 ani la Universitatea Rockefeller, New York, urmați de alți 6 ani la Universitatea Yale, New Haven. In acest timp visează, speră și face tot ceea ce este posibil pentru a creia conditiile introducerii biologiei celulare în țară. Dar, asupra aceastei perioade, vom reveni mai târziu, prin cuvintele Prof. Nicolae Simionescu.

După 10 ani, în 1979, se reîntoarce în țară, la institutul pe care împreună l-am visat, creionat, creat și al cărui director va fi timp de 16 de ani. În această perioadă, lucrează anual 9 luni în Romania și 3 luni în SUA, ca „visiting professor" la

Universitățile Yale și Columbia. Muncește enorm în cercetare, organizare, formare de tineri, îmbogățește Institutul și cercetarea noastră... În februarie 1995, trecea pentru ultima oară prin fața Institutului pe care l-a iubit atât de mult dar…, de data asta, însoțit de preoți și de o mulțime care-l plângea....

Dar revin la întrebarea: cine este omul din acest complicat Curriculum Vitae? Cine se ascunde în fapt în spatele atâtor pagini „seci" de realizări științifice, profesionale, sociale și organizatorice? Băiatul lui Dumitra și Vasile Simionescu era un copil frumos și normal de năzdrăvan. Din puținele mărturii adunate de la prieteni aflăm că la 7-8 ani, când se juca cu prietenii lui, el era „doctorul" (spune Cornelia Constantinescu, prietenă din copilărie) :

„Ne consulta păpuşile când erau bolnave şi îi permiteam să le facă injecţii cu acul de siguranţă. Era cel mai fericit când o auzea pe una tuşind. Avea spirt, vată şi vorbea cu ele asigurându-se că nu le doare…"

Merge la școală, unde este premiant cu coroniță în fiecare an, apoi la liceu, la fel. Un coleg de liceu, Paul Georgescu, azi profesor în Venezuela, isi aminteste:

„În prima clasă de liceu eu eram "chestorul" sau "monitorul" clasei, stăteam in banca întâi si prezentam "condica". Nu mă putea interesa un coleg cu "S"- coada catalogului, stătea în ultima bancă - şi, în plus, împărţea pupitrul cu… repetentul clasei. Mi-am schimbat curând aceste păreri, căci Simionescu era inteligent, ordonat, desena şi scria foarte frumos şi talentat la voley, basket, fotbal. Cânta in corul liceului, spunea poezii patriotice la serbări, la sfârşitul anului a luat după mine şi Dan Finţescu premiul trei. Noi ne străduiserăm mult, "care pe care", dar el nu făcuse vreun efort pentru a dobândi "acel detaliu", cum zicea el. Din clasa a doua, Nicolae Simionescu s-a maturizat si mai mult: era în toate echipele "de minge" ale clasei, recita din Eminescu la toate serbările, ca nimeni altul, se evidenţia la română şi latină şi, în continuare, nu-i prea păsa de matematică. De fapt, el decisese că se va face medic. In 1940 fuseserăm cu toţii "străjeri" şi unii băieţi chiar îşi exprimau simpatiile pentru un partid sau altul, dar astea pe amicul nostru nu l-au afectat în nici o formă. Citea mai mult ca noi şi, fiind mai liberal crescut de către părinţii săi, a început să meargă regulat, până şi noaptea, la teatru, la piese pentru "cei mari" şi la concerte. Nicuşor a "trecut" la italiană, pe când aproape toţi ceilalţi aleseserăm germana. A fructificat şansa de a-l avea profesor de italiană pe fiul lui Perpessicius, ce l-a prezentat marelui literat. Acesta i-a intuit "stofa" şi l-a stimulat şi el pentru a-şi dezvolta cultura".

"Tatăl său i-a fost un exemplu permanent şi l-a ajutat să-şi clădească meritata încredere în propriile forţe, fapt pe care savantul de mai târziu l-a recunoscut cu un amor filial inegalabil".

În facultate este fascinat de Prof. Gr. T. Popa; își petrece concediile citind și lucrând, fuge pe munte când poate, se reintoarce repede si apoi uită să mai plece din laborator. Perioada petrecută la Endocrinologie până la data plecării în "aventura americană" – a însemnat 300 lucrări publicate, multe în colaborare cu Prof. Milcu și cu mine. Monografia "Cancerul Tiroidian" publicată în Editura Academiei este cerută pentru publicare de către editurile Heineman din Londra și Academic Press din SUA. Simultan este și conferențiar la catedra de Anatomie.

Iată cum îl descrie Profesorul Ștefan Milcu:

"Tânărul Simionescu s-a impus printr-o impresionantă devoțiune în activitatea de investigare şi, surprinzător!, prin capacitățile organizatorice a unui laborator de specialitate. Am fost impresionat de modul deosebit în care își desfăşura activitatea. Ca un adevărat cercetător, "n-avea program". Rămânea în laborator până târziu în noapte. Vedea în microscop ce alții nu vedeau!"

Prof. Milcu s-a străduit să deschidă poarta cercetătorilor către lumea occidentală. El întocmea anual liste pentru plecări la congrese și specializări: primul pe listă era Nicolae Simionescu. Sistematic, anumite nume dispăreau de pe acele liste. Printre respinși figura, de fiecare dată, Nicolae Simionescu. "Dragă, i-a spus cu amărăciune Prof. Milcu, nu te vrea partidul, te-au scos de pe listă. Cică nu ai origine sănătoasă…" Aceste absurde refuzuri erau suportate cu stoicism de tânărul cercetător, spune Longin Popescu. Mai grav a fost faptul că an de an era pe lista celor disponibilizați de la Catedra de Anatomie a Facultații de Medicină. Era considerat un "element nedemn" pentru educația tinerilor. Nu avea origine sanatoasa. Din fericire, în fiecare an salvarea venea de la vestitul chirurg, Prof. Dorel Burghele, care era ministru și care anual punea rezoluția de neacceptare a concedierii sau "transferului", motivând "calitățile profesionale excepționale ale conferențiarului Simionescu".

În afară de profesiune, Nicolae Simionescu are un spațiu interior generos, plin de vise și de afecțiune pe care simte nevoia să o dăruiască. Și-a iubit enorm mama și și-a adorat tatăl, pentru care a avut un cult deosebit. Tatăl l-a dus pentru prima oară pe munte (la 5-6 ani) și a rămas toată viața cu o mare iubire pentru munte. A fost alpinist, schior iar visul lui era să ajungă în Himalaia. Are în bibliotecă tot ce s-a scris despre expedițiile în Himalaia, care îl fascinau… un vis neîmplinit.

Marea lui mândrie sunt băieții săi, Vlad și Dan. Le prevedea un viitor mare, era foarte exigent cu ei, dar o exigență plină de dragoste, tandră. Le lăsa toata libertatea de a se desfășura independent, dar îi veghea cu grijă din umbră. Crede profund în Vlad și Dan, nu încearcă să-i influențeze decât prin exemplul personal. În lungul timpului îi tratează totdeauna ca pe niște "băieți mari" care trebuie să-și ia singuri deciziile majore de viață. Și nu a greșit cu nimic...

Își adora mica lui nepoată, Adriana, libelula asa cum îi spunea. Iubea prietenii și prietenia; îi alegea cu mare grijă, dar odată aleși, le rămânea credincios toată viața. Își adula maeștrii. Iată ce spunea despre ei:

„Am avut deosebitul privilegiu de a lucra cu unii din cei mai remarcabili profesionişti şi oameni de ştiinţă care mi-au influenţat în mod hotărâtor întreaga mea activitate. Aceştia au fost: Prof. Gr. T. Popa (anatomie), Prof. Ion Juvara (chirurgie), Prof. Şt. M. Milcu (endocrinologie), cu care am lucrat împreună 18 ani şi Prof. George Palade (biologie celulară), lucrând împreună 10 ani la Universitatea Rockefeller şi la Universitatea Yale, SUA, urmaţi de 13 ani de colaborare, încă în curs. Rolul lor în formarea mea este inestimabil”.

Iubește copiii cu o tandrețe specială – între cele peste 15.000 de diapozitive din colecția lui, o bună parte, sunt figuri de copii din toată lumea. Iubește florile – florile de munte în general și, pe cele din Piatra Craiului, în special.

Cu aparența lui puțin austeră – era un model de grație și poezie interioară.

Cultura prodigioasă și memoria sa îi uluiau pe mulți: după 30-40 de ani de la terminarea școlii, recita versuri întregi în latină. Cunoaște toți fotbaliștii români, italieni sau francezi. Are o trăsătură romantică – ascunsă cu grijă - și un entuziasm fără limite, dar nu știe să se cruțe!

Deci, cine este Nicolae Simionescu?

Longin Popescu îl descrie cu har:

“Viaţa lui a fost de o intensitate puţin obişnuită, ca o flacără de magneziu. A fost un savant al inimii, dar niciodată al propriei sale inimi. Romantic prin destin, clasic prin rigoare şi caracter. Medic, chirurg, endocrinolog, biolog, profesor universitar, manager, academician. Aşa cum poetul, privind intens iarba, a devenit “doctor în iarbă”, Nicolae Simionescu, privind zeci de ani celulele corpului uman, a devenit doctor in biologia celulară. Prin crearea unui institut care să nu aibă alt scop decât să studieze celula inimii, a vaselor de sânge, acest savant “al subtilităţii extreme” a introdus, practic, înăuntrul cortinei de fier şi chiar dincolo de cortina ceauşistă de plumb, calul troian al gândirii libere”.

2. NICOLAE SIMIONESCU - CTITORUL

GENEZA ȘI DEZVOLTAREA INSTITUTULUI DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ

Ideea unui institut de biologie celulară în România a germinat în mintea Prof. Nicolae Simionescu imediat după sosirea lui in SUA. La doar 13 zile după ce a ajuns la Universitatea Rokefeller, Nicolae Simionescu notează în jurnalul său:

"Vineri, 13 Februarie 1970.

Cât de mult mi-au lipsit, şi mai ales la timpul respectiv, o atmosferă adevărată de viaţă ştiinţifică, de cercetare. Ce simplă e, ce firească şi de un singur fel; nu poate fi altfel, decât într-un sistem fals, artificial. O, dacă aş putea crea un astfel de crâmpei de viaţă adevărat, măcar pentru generaţia următoare de cercetători..."

Iată cum descrie Prof. Nicolae Simionescu (NS) crearea Institutului în interviul realizat de Dl. Nicolae Ţzone (NŢ) (interviul integral într-un capitol separat).

NŢ: ***Cum s-a născut ideea unui Institut de Biologie şi Patologie Celulară la Bucureşti?***

NS: „Naşterea acestuia a avut la bază un proces mai lung, în preajma căruia am putea glosa îndeajuns. Vedeţi dv., că vrei să te întorci sau nu vrei să te întorci în ţara ta de origine, că vrei să faci ceva acolo sau nu vrei, eu am considerat şi consider că este ceva foarte personal. Nu găsesc că am făcut ceva nemaipomenit prin faptul că ne-am întors în România. N-am făcut niciodată caz toţi anii trecuţi în privinţa aceasta, deşi, cum puteţi bănui, facilităţile şi propunerile de posturi de Chairman şi Profesor pe care le-am avut în America le depăşeau de nu ştiu câte ori pe cele ce urma să le primim în România. Dar, încă de la bun început, ideea noastră de bază a fost pur şi simplu să ne formăm acolo şi, cu ce învăţăm acolo, să ne întoarcem în ţară şi să facem un centru de cercetare.

Sentimentul acesta al instituţiei a fost foarte puternic la noi şi e foarte puternic şi acuma. Credem, şi eu şi Maya, în puterea instituţiilor. Trebuie să faci o casă, trebuie să ai o grădină în care să pui un pom. Trebuie să ai o casă, pe care să o înzestrezi cu tot ce este necesar pentru a putea, în felul acesta, să creşti nişte oameni în jurul tău. Nişte oameni deosebiţi. Să faci, ceea ce se spune, în termeni mai pedanţi, o şcoală. O şcoală pe care să o ridici la rangul de instituţie. Si cum în anii în care noi am început activitatea în America, virtual biologia celulară nu exista în România, gândul de a fi întemeietorii acesteia aici l-am avut în permanenţă. Profesorul Palade ne-a spus: "Mai staţi un an de zile. Unde să vă întoarceţi acolo?" El era foarte realist: "N-aveţi unde să lucraţi. Nu vă mai puteţi întoarce". Avea dreptate, pentru că la Bucureşti şedeam propriu zis într-un laborator în care exista un singur microscop cu lumină. Deşi lucram şi dormeam în laborator săptămâni după săptămâni, totuşi absenţa aparaturii era esenţială. De fapt, Palade ne-a şi explicat, la un moment dat, de ce ne-a invitat pe noi, la prima sa vizită în ţară, dintre toţi cei cu care a interacţionat: "Mi-aţi făcut impresia că sunteţi nişte sisifi amândoi şi mi s-a părut că-i păcat de voi să nu vi se creeze nişte condiţii de lucru rezonabile…"

Pentru mine probabil că era la mijloc şi un anumit sentiment care ţinea de biografia personală, legat în special, de frustraţiile pe care le-am îndurat în tinereţe. Pentru că am fost un chinuit în tinereţile mele, din punct de vedere a ceea ce am vrut să fac şi a modului dureros în care am fost marginalizat în permanenţă. Nu vreau să mă lamentez, şi nu vreau să discut despre greutăţile, inechităţile crase de atunci, dar nu pot să uit că mi s-au mâncat foarte preţioşi ani din viaţă. Astfel, că la un moment dat, în 1972, într-o suită de împrejurări care sunt foarte amuzante, m-am aşezat împreună cu Maya în faţa unei hârtii de împachetat şi am spus şi unul şi altul în acelaşi timp: "Hai să facem un Centru modern de biologie celulară, să adunăm nişte tineri în jurul nostru, sa-i formăm, ca un fel de familie şi să asigurăm, astfel, o oază de muncă, şi de linişte, şi de seriozitate."

Mai departe Prof. Nicolae Simionescu spune:

„Am făcut, Maya şi cu mine - şi acele schiţe iniţiale ne-au fost de mare folos - un plan detailat şi am selectat din tot ce văzusem la Rockefeller, în occident, cele mai viabile soluţii. Aşadar, pe scurt, din '73 până în '79 am revenit în ţară în fiecare an şi practic, am petrecut vacanţele noastre lucrând cu constructorii, cu arhitecţii, cu instalatorii. În '77 a fost şi cutremurul deosebit de violent, care a întârziat şi el lucările. Câteodată am stat în ţară o lună, altă dată 2 luni de zile. Profesorul Palade a fost foarte înţelegător, deşi ne spunea că suntem "patrioţi superstiţioşi", iar unii americani nu înţelegeau de ce ne trebuiau nouă asemenea complicaţii. Mulţi însă ne admirau pentru ceea ce încercam să facem.

După o perioadă intensă din toate punctele de vedere, la 3 septembrie 1979 Institutul a fost deschis oficial printr-un Simpozion inaugural de prestigiu." Printre invitaţi se numărau Profesorii George Emil Palade, Christian de Duve şi Gunter Blobel, toţi laureaţi ai Premiului Nobel.

Clipele de sărbătoare adevărată n-au ţinut însă prea mult pentru că ministerul ne-a adus la cunoştinţă că nu mai poate să ne asigure nici un fel de fonduri. Înţelegeţi, după ce am făcut tot ceea ce am făcut pentru înfiinţarea institutului, ni s-a spus: "Regretăm, dar din momentul acesta sunteţi fără nici un ban". Şi atunci soluţia a fost una singură: să apelăm la nişte subvenţii din afară. Am intrat, astfel, în sistemul de competiţie al Institutului Naţional de Sănătate din S.U.A., singura Institutie care la acel timp oferea grant-uri in afara ţării (The US National Institutes of Health, prescurtat NIH). Şi, spre şansa noastră, înregistrând scoruri suficient de bune, am primit timp de 12 ani subvenţiile solicitate în SUA. Am fost singurul institut din Estul Europei care a obţinut asfel de grant-uri din SUA şi unul din cele 7 granturi acordate în afara Statelor Unite (în afară de Argentina, Israel, Elveţia etc).

Pe lângă fondurile pe care le-am primit prin grant-urile amintite, obtinute de la NIH, fonduri care s-au ridicat în total la peste 400.000 dolari, din 1979 şi până în anul acesta, noi ne-am făcut un obicei - nu foarte confortabil, nu foarte simplu - din a aduna materiale pentru institut. În acest mod, colectam de la prietenii noştri, de la colegi, de la cunoscuți, chimicale, cărți, reviste, chiar unele piese de echipament şi aparate costisitoare. Le împachetam, le încărcam într-un camion la Univ. Yale (la 120 Km de New York) şi le duceam la aeroport. În medie am transportat o tonă de materiale şi echipament în fiecare an. Cu totul am adus in Institut până acum 14 tone. În acei ani, o doamnă ("tovarăşă") ministru a învățământului ne-a trimis în institut o comisie de anchetă aflând că ne-a venit de la aeroport un transport din coletele pregătite de noi în S.U.A pentru ca să afle ce şi de ce transportam materiale pentru Institut din SUA? Greu să priceapă de ce o facem!

La ideea Profesorului Palade, s-a stabilit o convenție formală între Ministerul Invățământului din România şi cel din SUA (în 1979) de a rămâne "visiting professors" la Yale. Ideea Prof. G. Palade a mers binişor 4-5 ani. Apoi a fost din ce în ce mai greu să plecăm din țară iar în 1989 am obținut aprobarea cu foarte mari dificultăți."

Profesorul Palade întrebat, la un moment dat, dacă a fost urmărit de Securitate, a spus:

"Am fost, probabil, urmărit de câte ori am venit să-mi văd surorile, să-i întâlnesc pe profesorii Nicolae şi Maya Simionescu, să particip la diferite simpozioane. Câtă vreme regimul nu-şi putea exercita în întregime influența asupra Institutului de Patologie şi Biologie Celulară (Institut care beneficia şi de o importantă finanțare americană), era firesc să fiu urmărit, deoarece eu veneam la întâlniri de lucru cu cercetătorii români. Ori, I.B.P.C. era, în mintea dictatorilor, o agentură de spionaj a CIA" (Curierul Românesc, iunie, 1992).

La Prima Sesiune Ştiințifică a IBPC, în 1980, Prof. Nicolae Simionescu spunea:

„În viitorul apropiat, ştim înspre ce ne îndreptăm, dar nu ştim ce vom găsi… Am elaborat planuri, dar nu şi predicții, pentru că, în realitate, dacă lucrurile ce vor fi găsite vor fi într-adevăr noi, ele sunt prin definiție necunoscute azi. Suntem tonifiați de fiecare observatie nouă şi, în acelaşi timp fericiți că suntem atât de ignoranți încât să facem din fiecare zi, când reintrăm în laborator, o confruntare cu propriul nostru intelect."

În descrierile sobre ale lui Nicolae Simionescu despre realizarea IBPC nu se dezvăluie greutățile enorme pe care le-am întâmpinat, lupta cu autoritățile, îndeosebi după 1979, eforturile şi reuşita în trimiterea a 14 tineri cercetători români în SUA pe

burse Fullbright pentru un an și apoi anual pe termene mai scurte sau mai lungi alți 15 – 18 cercetători, tot în SUA. Pentru fiecare trebuiau cam doi ani de lupte cu forțe oculte, circa 20 de semnături și tuturor li se găseau probleme (fie este prea tânăr, or neînsurat, or are rude în străinătate).

În 1984 Prof. Simionescu îl destituie (fără preaviz), în 24 de ore, pe șeful de Cadre al Institutului, pentru că făcea mizerii tinerilor noștri colaboratori; începând cu a doua zi, nu i-a mai dat voie să intre în Institut. Faptul nu a rămas fără urmări pentru noi, sunt sigură. Șeful de Cadre nu a mai intrat în Institut, dar l-a dat în judecată pentru că, dupa cum scrie: "măsura o consider abuzivă amintindu-mi de patronii capitaliști cu care nu putem avea țeluri comune, aflându-ne într-o permanentă contradicție antagonistă… ați încălcat legislația muncii socialiste… servesc cu devotament și profundă claritate cauza revoluției noastre socialiste."

Presiunile exercitate asupra noastră au fost din ce în ce mai consistente, mai dese. Organizat cu suport financiar de la NIH, la fiecare trei ani a avut loc un simpozion româno- american. După cel din 1989, am fost chemați imediat la minister și trași la răspundere:

"Trebuie să vă apărați, ni s-a spus, că aveți trei capete de acuzație. Primul că sunteți spioni, pentru că ați vândut secrete științifice românești americanilor. Al doilea, tot ce ați lucrat, toate temele pe care le-ați avut n-au fost niciodată aprobate de statul român și în al treilea rând că nu publicați decât în reviste străine."

Ni s-au cerut o serie de documente în apărarea noastră. În fine, o perioadă tristă! Am avut mare noroc cu schimbarea din 1989… Important rămâne că Institutul există și și-a căpătat un binemeritat prestigiu și în acest prestigiu se afla bucuros implicat chiar viața noastră și a întregii echipe de cercetători de aici.

3. NICOLAE SIMIONESCU – CREATORUL SOCIETĂȚII ROMÂNE DE BIOLOGIE CELULARĂ

Profesorului nu i-a fost îndeajuns crearea Institutului - deschis tuturor cercetătorilor din țară. El dorea o școală națională de biologie celulară. De aceea, în 1981, începe să gândească o Societate Națională de Biologie Celulară. O perioadă grea – nu se mai făceau Societăți. El reușește. În viziunea lui aceasta ***"trebuia să fie o societate interdisciplinară şi multidisciplinară – să fie prima de această complexitate şi unitate"***. Reușește!

În iulie 1982, are loc Ședința de înființare a Societății Naționale de Biologie Celulară (SNBC), la București. Cu acest prilej, Profesorul ne spunea:

„Nu e nevoie de "încă o Societate" ci, de una care să vrea şi să poată efectiv reprezenta un mijloc eficace de a ajuta dezvoltarea la parametrii deceniilor moderne a cercetării biomedicale, a învățământului biologic şi medical. SNBC să fie o Societate a unor oameni curajoşi, demni şi neabătuți în dorința de a face ceva bun pentru țara noastră.

De ce facem o nouă societate? (1) Ca să ne aducem aminte de minunații cărturari şi oameni de ştiință ai țării noastre care, în vremuri grele, au ştiut să găsească resursele spirituale şi fizice pentru a crea asociații şi societăți ştiințifice şi culturale ce au modulat hotărâtor istoria social-politică şi culturală a țării; şi (2) Să înțelegem obligația ce ne revine de a lăsa generațiilor viitoare un început de drum".

Societatea şi-a creat imediat 7 filiale în marile centre universitare din țară. Astăzi are 13 filiale. Sesiunile anuale au devenit în timp mai fructuoase pe plan ştiințific, au creat colaborări între centre şi au stabilit trainice legături profesionale şi umane.

Profesorul folosea fiecare sesiune anuală a SNBC pentru a ne împărtăşi gândurile sale profunde şi curajoase, a ne da speranță (în vremurile acelea nemiloase), a ne menține entuziasmul. Iată doar câteva exemple din cuvintele lui: Atenție! Suntem înainte de 1989!

În 1985, la Sesiunea SNBC de la Tg Mureş:

„Acum mai puțin de 200 de ani (1794), LAVOISIER a fost condamnat la moarte prin ghilotină de un judecător care i-a scris în actul de condamnare: "La Republique n'a pas besoin de savants". Existența şi activitatea SNBC arată nu numai că țara noastră are nevoie, dar şi că a şi produs oameni de ştiință capabili să contribuie în continuare la patrimoniul inestimabil al cunoaşterii. Asta nu înseamnă că nu mai există şi astăzi judecători deghizați care neînțelegând nimic din măreția revoluției ştiințifice continuă să condamne ceea ce nu înțeleg. În condiții care nu sunt deloc uşoare, Societatea noastră trebuie în continuare să pună la baza dezvoltării ei alături de ŞTIINȚĂ, SUFLET, PATRIOTISM. Astfel vom putea privi cu optimism spre anii ce vin, în care noile generații să facă să nu mai apară niciodată un alt judecător al lui LAVOISIER".

În 1986, la Sesiunea SNBC din Craiova:

„Să folosim şi această sesiune pentru o mai bună cunoaştere reciprocă,

mai adânc respect al muncii fiecăruia (în special a celor care o fac în condiții mai grele) şi ca un corolar să închegăm şi mai mult comunitatea noastră profesională, formată din oameni cărora le pasă, care n-au fost atinşi de ceea ce unii numesc "forma cea mai inferioară a libertății, anume NEPĂSAREA".

Sesiunea SNBC, Iași, 1987:

„Aflați aici în Iaşi, minunat lăcaş de cultură, în intimitatea minții şi sufletului nostru, să închinăm această sesiune nesecatei inteligențe româneşti… cea care a creat valorile care de-a lungul anilor, buni sau mai puțin buni, au asigurat regenerarea spirituală care a stat şi stă la baza permanenței acestui popor. Să privim cu optimism viitorul şi posibilitatea de a contribui semnificativ la progresul ştiințific".

Sesiunea SNBC, Constanța, iunie 1989:

„În epoca în care trăim, activitatea SNBC este o briză de cultură, un act de patriotism, dar patriotism înseamnă, în cazul nostru, ştiință mai multă şi mai bună. Nu sunt vremuri simple, dar sa avem un optimism activ. Şi să fim animați de sentimentul că prin această societate, împreună am făcut să încolțească o mică floare, asemenea Micului Prinț care îşi uda zilnic floricica pe care o sădise pe mica lui Planetă. Şi noi să îngrijim floarea noastră în năzuința că va deveni perenă şi nu numai să o îngrijim, ci şi s-o protejăm pentru că, aşa cum spunea anticul Dumneavoastră concetățean OVIDIU: "FELIX QUI, QUOD AMAT, DEFENDERE FORTITER AUDET" (Fericit cel ce cuteză să apere cu putere ceea ce iubeşte). Vă doresc cutezanță, putere şi mult succes".

După 1989, Societatea este la fel de tonică și activă iar Profesorul își continuă pledoariile pentru apararea cercetarii, a științei. Astfel, revenind la Tg. Mureș în 1994 în cadrul sesiunii anuale ne spune:

„Acum 9 ani, în 1985, la cea de-a III-a Sesiune Anuală a Societății Naționale de Biologie Celulară, ne-am adunat în acelaşi auditorium. Eram în plină perioadă de brutal anti-intelectualism pe care am avut curajul - şi nu fără urmări - de a-l demasca evocând soarta lui LAVOISIER care - exact acum 200 de ani (1794) - era condamnat la moarte prin ghilotină fiindu-i scris în actul de condamnare: "La Republique n'a pas besoin de savants!" În aceşti ultimi 9 ani, țara noastră a trecut prin zbuciume şi jertfe dintre care unele au dus şi la unele transformări în mai bine: - ca oameni de ştiință suntem liberi să ne ducem unde vrem, să spunem ce vrem, să colaborăm cu cine vrem. Şi totuşi aceste evidente câştiguri nu ne sunt de ajuns. Şi fără a însemna că ne lamentăm trebuie să spunem

pe nume condițiilor de viață foarte grele şi facilităților de lucru nesatisfăcătoare. Desigur nu mai trăim în vremuri ca acelea ale lui Lavoisier dar, din păcate, ştiința în România nu a ajuns la statutul pe care-l merită deoarece sunt unii care din incompetență ignoră ştiința şi pe cei care o slujesc. Mai mult, alții contestă rolul cercetării, şi îndeosebi a celei fundamentale în progresul socio-economic, în felul acesta condamnând ceea ce nu înțeleg. De aceea, în aceste vremuri, comunitatea ştiințifică trebuie să iasă din pasivitate şi să-şi impună punctele de vedere pentru a schimba mentalitatea organelor de decizie. Democrația nu înseamnă populism şi politicianism declarativ. Democrația implică competență, responsabilitate şi intelocrație".

4. NICOLAE SIMIONESCU - CERCETĂTORUL - PROFESORUL

Cercetătorul. Nicolae Simionescu privea cu cucernicie cercetarea ştiințifică. O socotea, după cum scria în 1984:

„Efortul intelectual cel mai creator de care omul este capabil. In istoria omenirii, nevoia de cunoaştere a apărut ca o trăsătură definitorie a ființei umane. În lupta cu natura, omul a trebuit să caute sau să creeze mijloace de adaptare, apărare sau atac. Astfel, cunoasterea din curiozitate a fost ulterior arbitrar definită "cercetare fundamentală", iar cunoasterea generată de nevoia de soluții a fost, într-un sens foarte larg, numită cercetare aplicativă. Această taxonomie este larg criticabilă, iar folosirea acestor termeni operaționali în politica ştiinței a creat şi creează încă dificultăți şi uneori erori în soluții."

„...Cercetarea fundamentală în biomedicină are prin obiectul ei - omul - cea mai aplicativă dintre cercetări deoarece se adresează omului ca fiind nu numai pateticul nostru capital dar neîndoielnic unicul producător al oricărei alte cercetări."

Iată cum îl privește Prof. Milcu pe cercetătorul Nicolae Simionescu:

„În acest tânăr, care a apărut în fața mea, am simțit imediat patosul, acea forță interioară căreia nu-i rezistă nimic. Ce tensiune interioară, ce aspirație spre cunoaştere că în fond ştiința la asta ne aduce: la cunoaştere şi la o reflectare mai reală a tot ceea ce vedem căutând, dacă ai insomnie, explicația a tot ce ai văzut în ziua aceea. Şi el într-adevăr a demonstrat-o din plin. Nicolae Simionescu ştia că atunci când începe o cercetare dacă trebuie să stea noaptea, rămâne noaptea până termină şi i-am spun: "Vezi că acolo au trecut mulți şi nu au văzut, poate vezi tu." Şi într-adevăr, în cancerul glandei tiroide, în care trecuseră alții, el a reuşit să vadă cancerul medular. Acei ochi pătrunzători şi mintea care se ascundea îndărătul lor, cât au pătruns în ceea ce alții nu au văzut. A fost un descoperitor."

Dușmanul său cel mai aprig era timpul. În 1970 la Universitatea Rockefeller, scria în jurnalul său:

„Îmi place atât de mult ce fac şi cât învăț, încât simt o cronică lipsă de timp. Mă simt ca Pigafetta, (cronicarul şi biograful lui Magelan): caut drumul prin endoteliu (continentul american cu porțiunile lui turtite) spre spațiul extracapilar (Oceanul Pacific)..."

Ideile și descoperirile profesorului Nicolae Simionescu sunt ample, originale și preluate rapid de comunitatea științifică internațională. Colaborarea excelentă cu profesorul S. Milcu a îmbogățit substanțial literatura de specialitate în studiul glandelor endocrine, îndeosebi a tiroidei și suprarenalei. Cartea lui despre tiroidă i-a adus recunoaștere internațională și premiul Academiei Române. Noile date aduse în colaborare cu prof. George Palade și cu mine în studiul transportului macromoleculelor prin endoteliu au avut darul ca, în 10 ani, disputa dintre biologii celulari și fiziologi să se apropie de un punct de vedere comun. Descoperirile și ipotezele noastre asupra rolului veziculelor în transport au fost validate în decursul timpului prin tehnici moderne de biologie moleculară și azi, sunt total acceptate în literatura științifică. Termenul și conceptul de "transcitoza" și mecanismele sale au devenit atât de clasice, încât nici nu mai este citat autorul, Nicolae Simionescu. Nu cred că l-ar supăra.

Profesorul. Prin anii 1960, lucrând la Institul de Endocrinologie am fost de mai multe ori la cursurile de Anatomie ale Profesorului. Erau fenomenale. Studenții îl primeau cu aplauze, iar la sfârșitul cursului pleca tot în aplauzele studenților; el se simtea evident stânjenit. Interesant, după 20 de ani, la Universitatea Yale, alte cursuri, alți studenți, aceleași aplauze. Studenții l-au propus ca "Teacher of the Year" pentru Premiul Borum. Îi plăcea să predea, să explice, să comunice, să transmită. Avea vocație pentru catedră, după cum avea vocație pentru laborator: era răbdător, jovial și exigent. Una din maximele sale era:

"Accept pedeapsa exigenței
Detest iertarea indolenței".

David Castle, un fost student american al Profesorului spunea:

„Nicolae Simionescu a fost un maestru al predării prin metoda socratică şi a fost întotdeauna principalul meu model de urmat. Mă simțeam fericit, când ştiam că este mândru de mine".

5. NICOLAE SIMIONESCU – MEMBRU AL ACADEMIEI ROMÂNE (1990); VICE-PREȘEDINTE (1994-1995)

Prof. George E. Palade a sesizat cel mai bine rolul pe care Nicolae Simionescu și-l asuma în Academia Română. El spune:

„Nicolae Simionescu a acceptat aceste noi responsabilități cu sentimentul misiunii de a îmbunătăți condițiile şi nivelul de finanțare al cercetării în România. Ceea ce el a simțit că este valid şi are succes în țările vestice a încercat să le adapteze la nevoile comunității ştiințifice din țară".

În 1994, ales Vicepreşedinte al Academiei Române lansează un „Plan de acțiuni pentru îmbunătățirea cercetării ştiințifice în Academia Română" – un plan larg, sistemic şi temerar pentru reforma activității de cercetare în Institutele Academiei. In cadrul multiplelor acțiuni anvizajate, a inițiat primul sistem de Grant-uri competitive de cercetare în România. A fost primul pas făcut de Prof. Simionescu şi conducerea de atunci pentru un viitor mai bun al cercetării.

Iată ce spune Nicolae Simionescu în mai 1994 inaugurând în revista "Academica" rubrica inspirat intitulată "Quo Vadis Academia?":

„(1). Este notoriu că Ştiința contemporană avansează într-un ritm extrem de alert la care toate comunitățile ştiințifice fac un deosebit efort de a se racorda.

Chiar dacă cercetarea ştiințifică (CS) în Academia Română (AR) ar merge excelent, totuşi prin natura şi scopurile ei în permanentă adaptare, activitatea de cercetare se cere în continuare ameliorată. Din păcate însă, datorită unui complex de motive, cercetarea în Academia Română nu atinge decât în puține domenii performanțele la care o îndreptățeşte potențialul intelectual al acestei institutii. Îmbunătățirea CS reclamă unele reconsiderări în mentalitate, management, structură instituțională, mecanisme de finanțare etc.

(2) Dacă nu facem un efort să modernizăm şi să revitalizăm CS în Academia Română, fără voia noastră vom fi părtaşi la pericolul grav al perpetuării şi adâncirii decalajelor tehnologice şi de competitivitate ale României şi prin asta la pierderea identității patrimoniului intelectual românesc în cadrul comunității ştiințifice internaționale.

(3) Modernizarea condițiilor de lucru şi asigurarea nivelului de trai corespunzător misiunii sociale a omului de ştiință, este cel mai bun remediu al "brain-drain-ului" pentru prevenirea căruia, din păcate, nu se întreprinde nimic. De aceea, este esențială luarea urgentă de decizii politice care să ateste concret că,

chiar şi într-o perioadă de declin economic, sprijinirea cercetării fundamentale este o datorie morală a Statului. Investiția constantă în ştiințele de bază şi în formarea noii generații de scientişti este cea mai lucidă şi mai sigură investiție în viitor.

Pe firul continuității valoroaselor nostre tradiții, avem datoria morală să încercăm să asigurăm apariția spiralelor ascendente ilustrate de Salieri, dar şi de cât mai mulți Mozart.

În cadrul acestor măsuri, Academia Română va institui începând cu anul 1995 o finanțare competitivă a cercetării ştiințifice prin Grant-urile Academiei Române (GAR). Sistemul GAR introduce principiile stimulative ale liberei competiții în ştiință care a constituit şi reprezintă şi în prezent una dintre cheile remarcabilelor progrese ştiințifice şi tehnologice obținute în țările avansate; el va funcționa concomitent cu finanțarea pe programe şi proiecte în cadrul instituțional actual al Academiei Române."

Din păcate, timpul nu i-a dat răgazul să facă tot ceea ce și-ar fi dorit pentru cercetarea din Academia Română și din România.

Considera Academia locul unde trebuie să coexiste: maxima scientia et maxima moralia (Maya Simionescu și Nicolae Simionescu, Academica 2001).

Ideile Profesorului despre Academie au fost sintetizate de el în următoarele puncte:

„1. Academia este o parte şi o emanație a cercetării ştiințifice;

2. Academia are nevoie de un sistem de criterii obiective pentru evaluarea unei candidaturi;

3. Academia are nevoie să primească tineri scientişti;

4. Generația „calendaristică" vs. generația „ştiințifică". Aici se impune o precizare. Spiritul nou şi concepția modernă asupra cercetării şi organizării ei nu sunt un atribut exclusiv al generațiilor mai tinere. Prin pregătire, experiență, condiții de lucru, calități personale, potențial biologic şi performanța profesională, fiecare dintre noi poate fi definit şi prin doi parametri care reflectă apartenența la o anumită "generație": "biologică" sau "ştiințifică". Academia este o emanație şi o parte a cercetării ştiințifice

Generația „biologică" (calendaristică) se dovedeşte, în unele cazuri, a fi neesențială, cum este exemplul unor eminenți oameni de ştiință, ca Prof. Ştefan Milcu sau Prof. G. E. Palade (şi exemplele sunt numeroase). Beneficiari ai unei structuri biologice şi intelectuale de excepție, prin felul în care gândesc şi acționează ei au aparținut şi aparțin în continuare generației ştiințifice tinere, de avangardă. Cât de relativ este impactul generației biologice asupra performanțelor profesionale se poate vedea şi în strălucitele exemple din alte domenii, ca cele ale artei şi culturii (P. Picasso, P. Cassals, A. Rubinstein, A. Horowitz etc.)."

6. NICOLAE SIMIONESCU - ROMANTICUL GÂNDITOR

Poate aceasta este partea cea mai ferită de lume a profilului uman al lui Nicolae Simionescu. Iată câteva din gândurile sale pasionate și pasionante despre cercetarea științifică:

„Cercetarea ştiinţifică este mai mult decât o profesie, este un mod de a trăi, cu strădanii reuşite alături de încercări nereuşite, iar între ele marea agitată a îndoielilor care te invită la înţelepciune. Iar în lupta dintre bucuria succeselor şi amăreala eşecurilor, principalul instrument de conservare rămâne pasiunea."

„Nu se poate construi nimic durabil, dacă în materialul de construcţie nu este adăugat "quatum satis" - suflet. Fără dăruire nu poţi deveni niciodată ceea ce admiri".

„Cercetările de Biologie Celulară şi Moleculară din ţara noastră trebuie să se adreseze din ce în ce mai mult marilor probleme ale materiei vii… Ştiinţa mare este generată de întrebări mari şi de setea de răspunsuri la marile întrebări ale cunoaşterii, răspunsuri care odată obţinute vor genera noi întrebări şi mai profunde… Năzuinţa biologilor celulari spre adevărul ştiinţific este o izbândă a adevărului în general de care societatea noastră are atâta nevoie… Orice minte lucidă, poate înţelege că România intră mai repede în Europa şi Lumea civilizată în primul rând prin cultură şi ştiinţă şi mai puţin prin autoturisme Dacia sau Lăstun… De pe o astfel de poziţie, finanţarea corespunzătoare a Cercetării Fundamentale nu apare ca un lux ci ca cea mai potenţial productivă investiţie în inteligenţa românească. Cu atât mai mult cu cât avem în ţară laboratoare de Biologie Celulară care sunt de mult şi bine intrate în Europa şi în Lume… Nesusţinându-le riscăm să distrugem şi puţinele capete de pod construite atât de greu… Orice minte informată, ştie că nu se poate sconta pe un progres economic fără sprijinirea cercetării fundamentale…"

„Desigur, ignorarea cercetării, are ca efect negativ şi HOMORAGIA alarmantă la care asistăm: internă, spre alte profesii mai productive şi externă, care duce la un vid de valori şi absorbţia de demagogi şi nonvalori. Speranţa rămâne în cercetătorii tineri - infuzie de "fresh blood". În condiţiile lipsurilor actuale, ştiu că e greu să vorbeşti despre PATRIOTISM.. Şi totuşi…
Dacă Dăruire nu e, nimic nu e…"

În puținele ore de răgaz, sculpta în lemn, compunea muzică, și scria poezii. Dragostea pentru poezie, pentru cultura și pentru marile noastre valori culturale s-a tradus prin ideia Profesorului de a organiza în institutul nostru "Comemorarea lui

EMINESCU" – la 25 Iulie 1989, când cei 100 de ani trecuți de la dispariția marelui poet nu au fost aproape nicăieri amintiți în țară.

Iată secvențe din gândurile Profesorului exprimate la deschiderea Sesiunii de comemorare a lui Mihail Eminescu:

„A comemora (a ne aminti împreună) pe Eminescu nu este numai un act de pietate și un câștig în înțelegerea valorilor culturale care definesc poporul român, ci și un prilej să reînvățăm a stima și a iubi."

„....De la conceperea lui, institutul nostru a fost gândit ca o instituție de cultură în care se lucrează știință. Această concepție avea la bază două idei general acceptate. Prima: Știința este parte a culturii, iar a doua: Cultura înseamnă deopotrivă trei lucruri: creație, asimilare și transmitere de valori. În fond, acest mod de a concepe un Institut, pune, la o scară foarte restrânsă, problema generală a rolului culturii în formarea unui om de știință.

Istoria Științei arată că un cercetător poate ajunge la o exprimare deplină a personalității lui creatoare, atunci când este sensibilizat prin cultură. Pe plan individual este problema relației între creatorul de artă și receptorul (nu receptorul celular) om de știință. Orice receptor este un potențial creator, deoarece însăși asimilarea unei valori literare sau artistice poate conține componente ale unui act autonom de creație. Această fațetă a relației cultură-știință, dă un sens mai complex cunoscutului Homo Cogitans - Homo Significans.

„...De la început (în Institut, n.r.), noi cei doi "seniori", am avut sentimentul responsabilității de a le asigura aici nu numai aparate, chimicale și cărți, ci și condiții pentru o formare complexă, în care să se îmbine armonios un înalt profesionalism cu o largă și nesăturată deschidere spre mesajele perene ale culturii."

„...Și atunci, ca și acum, am fost profund convinși că, mai mult ca oricând, țara noastră are nevoie nu numai de buni tehnologi, ci și de creatori de știință sensibilizați și fertilizați prin cultură. Din astfel de oameni ies marii **patrioți**."

„...Ca biologi, am înțeles foarte bine că așa cum unele viețuitoare trăiesc în apă sau aer, omul trăiește în cultură, acel "ceva" dincolo de binele sau răul cotidian. Dar, tot ca biologi, ne-am dat seama că în lumea contemporană (deseori "o lume ca nelumea"), așa cum toate mediile naturale sunt poluate și cultura poate fi poluată. De aceea cred că este oportun să vorbim azi de o ecologie a culturii la care avem datoria de a participa activ pentru identificarea și combaterea surselor de poluare și a gravelor efecte pe care le pot avea asupra purității și viabilității moștenirii spirituale pe care o transmitem viitoarelor generații."

„....Pentru orice societate, inclusiv a noastră, progresul depinde de capacitatea de a forma "masa critică" de oameni demni, capabili şi fermi să orânduiască natural scara valorilor, împotriva poluantei non-valori".

„...Mihai Eminescu,... care, în numai 15 ani de creaţie, ne-a dăruit alături de o inegalabilă poezie, peste 14 000 de file de manuscris adunate în 44 de caiete. ...De ce sunt atât de importante pentru noi caietele lui Eminescu? Pentru că ele reflectă o imensă sete de cunoaştere pentru tot: filozofie, filologie, economie, istorie, etc. Şi, deşi Eminescu nu şi-a luat Doctoratul, caietele lui conţin zeci de pagini de adnotări de biologie, chimie, fizică, matematică. Comemorându-l pe Eminescu, reiterăm îndemnul, adresat îndeosebi tineretului nostru, pentru încredere în geniul creator al poporului român şi năzuinţa activă spre o formare complexă".

Cât de adevărată gândire... și curajoasă... repet, eram în 25 iulie 1989.

Profesorul compunea muzică, sculpta și scria poezii. Multe, frumoase și ținute ascuns de ochii lumii. Nu știu ce este firesc să fac cu ele... Acum, aici am să destăinui o poezie scrisă de el cu mulți ani în urmă, dar care azi, are o încărcătură emoțională specială:

„OGLINZI

„Eu însumi am crescut în mine.
Şi cel mai acru rău şi cel mai zdravăn bine
Nimeni nu mi le-a dat
în măsura în care le-am adunat.
Şi am să fug singur cu ele-n gol
în ziua în care am să uit să mă scol.

Privind lumea din colț
întind mîna spre mijloc, iar uneori
privind-o din mijloc implor
pentru încă-un mîine.

De fapt, oglinzi
pretutindeni oglinzi
aproape numai oglinzi.

New York, 29 mai 1970"

Duminică, 5 februarie 1995, în seara în care s-a culcat și "a uitat să se scoale", scria un articol despre "Rolurile Academiei Române"…..

NICOLAE SIMIONESCU EXISTĂ ŞI VA EXISTA ÎNTOTDEAUNA PRIN GÂNDIREA LUI

ACADEMICIAN
NICOLAE CAJAL
Preşedinte al Secţiei de Ştiinţe Medicale a Academiei Române
Preşedinte al Academiei de Ştiinţe Medicale

Este foarte dificil să evocăm în cateva cuvinte marea personalitate pe care a reprezentat-o, o reprezintă şi o va reprezenta în continuare pentru cultura românească, Nicolae Simionescu. Am avut privilegiul să-i cunosc evoluţia, să-l văd în curtea Facultăţii de Medicină când iesea în pauze de la anatomie, să-l văd în apropierea Prof. Gr. T. Popa, de care era foarte legat, să-l cunosc apoi mai bine la Institutul de Endocrinologie, pe care îl vizitam câteodată şi de câte ori eram la institut, urcam şi în laboratorul unde Nicolae Simionescu lucra de un timp împreună cu Maya Simionescu.

S-au amintit aici contribuţiile lui ştiinţifice, contribuţiile lui ca profesor şi creator de şcoală, ca întemeietor de institut. Voi încerca sa vă expun câte ceva despre colegul Nicolae Simionescu, la un moment dat chiar colaborator (după 1990) în cadrul Academiei Române, dar mai ales ca prieten. Trebuie să vă dau câteva exemple din care să vedeţi că ceea ce spun nu sunt aspecte conjuncturale. În general, Nicolae Simionescu a fost un om cu totul deosebit, un om cu o serie de calitati rare, cu o activitate pe care, nu orice om putea să o desfăşoare, cu o deosebită înţelegere şi o memorie cu totul neobişnuită. Am amintit aici calităţile lui de om şi de coleg.

Vreau să adaug la asta, evocând o anumită întâmplare, pe care poate nici Maya nu o cunoaşte. Îmi aduc aminte de momentul în care prof. Burghele şi Paul Niculescu Mizil încercau să găsească un loc pentru crearea, construirea unui nou institut sau poate, după ideile prof. Burghele, nu de a construi, ci de a plasa într-un alt institut, institutul lui Nicolae Simionescu. Am avut initial spaima şi apoi - graţie lui Nicolae Simionescu - bucuria de a-mi da la o parte aceasta spaimă, pentru că se insista foarte mult pe ideea de a se lua clădirea Institutului de Virusologie si de a se realiza acolo ceea ce trebuia sa fie opera lui Nicolae şi Maya Simionescu, Institutul de Biologie Celulară. De aici, reiese ideea pe care o susţineam mai sus, caracterul său de prieten, coleg şi

om: refuzul total a lui Nicolae Simionescu de a se realiza această idee năstrușnică, de a plasa noul său institut în clădirea Institutului de Virusologie. Mai mult, Nicolae Simionescu a fost un om care a apărat Institutul de Virusologie și ideea de a nu se strica munca altora. Am avut ocazia să discut foarte des cu el, mai ales după alegerea lui la Academia Română, unde am avut chiar bucuria sa fiu printre cei care au propus alegerea lui ca membru corespondent. Prof. Drăgănescu, pe atunci Președinte al Academiei, a ținut foarte mult la personalitățile lui Nicolae și Maya Simionescu, fiind susținut și de ceilalți colegi, care știau și recunoașteau valoarea deosebită a soților Simionescu.

Academicianul Simionescu s-a luptat pentru tenacitate și seriozitate în cercetare; spunea in permanență că este speriat adesea de ideea incompetenței și că trebuie făcut totul pentru ca in cercetare, amatorismul să fie înlocuit de seriozitate și competență. Într-adevăr, el a fost nu numai un susținător al acestor idei, dar și un luptător pentru ele. Am participat cu el, împreună cu Academicianul Ștefan Milcu, Prof. Mihai Zamfirescu și alti colegi la elaborarea Statutului Academiei de Medicină pe care el dorea a-l face un statut viabil și să transforme Academia de Medicina dintr-un for, oarecum sindical, într-o societate științifică reală. Seriozitatea cu care în întalnirile noastre din fiecare după-amiază, Nicolae Simionescu se lupta pentru fiecare cuvant din statut și fiecare noțiune este absolut remarcabilă. Nu accepta nici un fel de superficialitate, nici măcar într-o virgulă sau nici măcar într-un adjectiv pus nepotrivit. Era absolut deosebit, lucru pe care l-au confirmat și relatările unui coleg al meu din institut, Radu Iftimovici, care a scris o carte după o serie de interviuri despre Palade. El îmi povestea impresiile Prof. Palade despre Nicolae Simionescu. Acestea coincid în totalitate cu ceea ce a spus Maya și cu ce știm noi, și toate se bazau pe aceeași temă, credința în puterea stiinței și necesitatea dezvoltării și sprijinirii științei. Avea credința că, așa cum pe vremuri, se spunea despre o catedrală că era imaginea unui regim, a unei țări, a unui teritoriu, cercetarea științifică, institutele de cercetare sunt cele care au misiunea și menirea în acest moment, să aducă stălucirea țării noastre.

Dupa alegerea la Academie, Nicolae Simionescu a fost personalitatea care a sprijinit această institutie prin poziții oficiale sau mai puțin oficiale. Eram vicepreședinte in acea perioadă și m-am sfătuit foarte mult cu el. Trebuie să vă spun că era încăpățânat în dorința de a sustine un lucru bun, important și avea dreptate întotdeauna. A fost o personalitate care într-adevăr a sprijinit Academia Română, a sprijinit Academia de Medicină și a dorit ca aceste instituții să fie la nivelul la care le gândea și el; și le gândea și după ce văzuse și după propria lui imaginație, în condițiile în care el credea total în știință. Este de remarcat lupta lui pentru crearea Comisiei de Biotehnologie, la care am lucrat împreună. Am vazut în permanență gandirea lui; începuturile lui "Quo Vadis Academia", erau cu adevărat credințele lui și cred că ar fi fost și trebuie să fie în continuare gândite și preluate, pentru că reprezintă momente cruciale în evoluția cercetării științifice în țara românească.

Știu eforturile pe care le-a facut împreună cu Maya pentru crearea acestui institut, care astazi a ajuns un institut de mândrie pentru Romania, institut european de excelență. Eforturile lor gândite și pregătite, cum spunea domnia sa, pe o coala de hârtie, planurile centrului de biologie celulară, trebuie să știți că ele erau susținute permanent de Nicolae Simionescu la toate întâlnirile la nivelul ministerului Învățământului, la Consiliul Național pentru Știință și Tehnologie, apoi în Academia Română și Academia de Medicină.

Alegerea lui și a Mayei Simionescu ca membri corespondenți ai Academiei Române, apoi ca membri titulari nu sunt conjucturale, au fost absolut necesare, au fost o necesitate pentru evolutia cercetării în țara noastră, pentru evoluția gândirii în biologia celulară și nu numai. Pentru că, eu consider că activitatea lui, lupta lui pentru nou, erau necesare în relația dintre cercetare fundamentală și cercetarea aplicativă. Există două cercetări sau există numai o cercetare în care se aduce lucrul nou; toate acestea sunt de retinut, sunt memorabile pentru noi toți. Și cei care am avut norocul să trăim pe lângă el, să-i cunoaștem activitatea lui si a altora din grupul lui sunt benefice nu numai pentru memoria față de activitatea lor dar si pentru activitatea noastră și a colegilor noștri în general.

Cred că nu trebuie să vorbim de Nicolae Simionescu la trecut, trebuie să vorbim de Nicolae Simionescu care există prin gândirea lui și va exista în continuare prin tot ce a făcut pentru crearea școlii de biologie celulară și știința românească.

ÎNTÂLNIREA MEA CU PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU

ACADEMICIAN CONSTANTIN POPA
Director al Institutului de Boli Cerebrovasculare „Prof. Vlad Voiculescu"

Prima mea întâlnire cu Profesorul Nicolae Simionescu a avut loc în perioada studenției mele, întâlnindu-l ulterior în nenumărate alte situații. Am să-mi permit să evoc acum, câteva din aceste întâlniri. În ansamblul cunoașterii acestei mari personalități umane, aceste evocări ar putea să fie neobișnuite pentru o parte din colegii care au fost în aceeași perioadă cu mine, studenții Facultății de Medicină Generală din Universitatea "Carol Davila", fostul Institut de Medicină și Farmacie din București.

Înainte de toate, aș vrea să spun că, încă nu este momentul să se facă o evaluare a profesorului N.Simionescu; este însă momentul în care să ne aducem aminte, în fiecare an despre acest mare om de știinta și mare dascăl. De o mare complexitate umană, așa cum a definit-o atât de bine d-na Acad. Maya Simionescu¸ personalitatea Profesorului, nu cred că este posibil să fie încadrată cu exactitate, el depășind de departe tiparele vremii sale... Și mai cred că întâlnirile anuale, în care vedem ce-am făcut și cum ne plasăm vis-a-vis de cel care ne privește acum de la distanță, în orice domeniu al cunoașterii științifice, sunt necesare și utile atât pentru cei aflați la o anumită vârstă, cât și, mai ales, pentru cei tineri.

Eu consider că istoricește mai este timp să așteptăm și pentru faptul că Prof. Nicolae Simionescu ne demonstrează o continuitate. Este vorba astăzi de o continuitate și nicidecum o întrerupere. Prof. Nicolae Simionescu nu a dispărut. Uitați-vă în reviste! Dar pe de altă parte, dacă ne uităm la evoluția sa în timp, eu cred că cercetarea științifică universală și-a permis un mare lux și anume acela de a folosi un om pentru cunoașterea umană, un om care a parcurs pe riscul său personal de efort, de imaginație, de inteligența, dar mai ales riscul de sănătate, niște etape absolut surprinzătoare de la morfolog - anatomist riguros, la anatomo-patolog, la explorationist, la genetician ș.a.m.d. până la cercetarea ultrastructurală într-o variantă unică.

Aș zice un parcurs ideal; ce este mai potrivit pentru un om care a parcurs întreaga

biologie umană în structura sa macroscopică și microscopică, ani de zile, zeci de ani de zile, de la normal, cu Prof. Gr.T. Popa și ulterior singur și cu alți colaboratori? Ce este mai extraordinar să fi parcurs apoi morfo-patologia în variantele sale, cu predilecție în endocrinologie, pentru ca, în final, să realizeze o dezvoltare în aria mirifică ultrastructurală în care, îmi închipui, cu câtă dezinvoltură a pătruns, eliberat de "chinga" aceea, "coerciția" aceea pe care o dădea anatomia clasică pe care noi o învățam atunci de la alții, iar de la dânsul o învățam cu totul și cu totul altfel.

M-am uitat într-o carte excelent scrisă de prof. Costin Cernescu cu laureații premiului Nobel ai secolului al XX-lea. O carte interesantă. Am vrut să văd și eu dacă printre acești importanți laureați ai sec. XX, în spatele cărora, știm că au existat totdeauna un număr de oameni de știință care meritau în egală măsură să primească premiul Nobel, cu cine se poate compara prof. Simionescu? Am putut observa că nu se poate compara cu nimeni. Nu e nici o exagerare în aceasta afirmație. Este afirmația mea, că el este deasupra tuturor, prin modul în care s-a format, prin modul în care a fost dăruit biologic și prin modul în care a gândit cercetarea științifică, nu numai în România, ci în lumea întreagă. Încât, în această perspectivă, intervenția mea pare minoră deoarece se știe foarte bine pe mapamond, cine este prof. Nicolae Simionescu.

Și mă gândesc că ceea ce trebuie să reținem noi este spiritul în care el a lucrat, calitatea spiritului așa cum o concepea Goethe care spunea că "o calitate a spiritului este tocmai aceea de a stimula veșnic spiritul". El este unul dintre puținii oameni de la noi și din lume, care cred că se poate plasa aici. El nu ne va lăsa niciodată să fim liberi; nu ne va lasa niciodată să lucrăm independent, referindu-mă la rigoarea științifică, la calitatea umană și la responsabilitatea umană. Aflat, adesea, într-un loc sau altul de pe Terra (acest lucru nu cred că a avut prea mare importanță), Prof. Simionescu s-a simțit întotdeauna bine, pe teritoriul românesc.

Și acum, câteva din întâlnirile mele cu prof. Nae Simionescu (îmi permit să nu spun Nicolae Simionescu, pentru că acest nume a devenit atât de obișnuit, încât sensul lui nu este deloc peiorativ). Poate că și aceasta a făcut parte din elementele, care ne-au apropiat, până acolo încât, n-o să credeți, chiar și în perioada studenției, aproape că ne provoca să-i spunem așa, fiind evident că n-o puteam face…

Însă întâlnirea cu adevărat importantă cu prof. Simionescu s-a produs, pentru mine, în cercetarea științifică. Am urmărit de-a lungul timpului ce a făcut în domeniul vascular, domeniu de care mă ocup și eu. Eram așa de încântat de ceea ce observam în articolele apărute sub semnătura Prof. Nicolae Simionescu și Maya Simionescu. Era, dacă vreți, parte din noi și o parte din mine și, mă făcea să citesc articolul până la capăt, interesându-mă nu numai conținutul, ci și cel care-l scrisese, întrucât știam foarte bine despre cine este vorba.

Prima întâlnire cu prof. Simionescu a avut loc în perioada studenției (în anii 1958-1964), perioada în care prof. Simionescu era șef de lucrări la Anatomie; am avut șansa ca seria în care eram eu, să-l aibă responsabil de lucrări practice și, respectiv, de un curs de anatomie. O parte din cei de față își pot imagina această perioadă, altă parte nu și-o pot imagina, nefiind familiarizati cu atmosfera din acea vreme. După cele ce vă voi spune, veți observa că a fost pentru noi, tinerii studenți, necunoscători în multe, o perioadă relevantă din punct de vedere al condiției umane.

În primul rând, în sala de disecții, în timp ce noi lucram cu asistenții, era un permanent zumzet, erau 10 grupe care lucrau simultan. Noi lucram cu un valoros chirurg Dr. Oghină, care era mult mai în vârstă decât prof. Simionescu. În momentul când intra în sală prof. Simionescu, toată lumea înceta să mai vorbească, era o liniște totală; parcă-l văd și acuma, înalt, brunet, cu halat alb, șorț alb în față, căci așa se purta atunci. Un bărbat frumos! Îl apreciam, în egală măsură, cu toții, pentru că impunea prestanță, dar nu în sensul în care s-ar putea presupune - în relația profesor-student - ci în sensul distanței față de un om, la care, credeam noi, că niciodată nu vom putea să accedem, nici măcar cu un cuvânt. A trecut pe la fiecare grupă. A venit și la grupa noastră. Dr. Oghină s-a ridicat în picioare și l-a întrebat ceva. Noi disecam un trunchi cerebral. „Spuneți-mi și mie ce observăm dacă facem secțiunea aceasta oblică?" Avea obiceiul, ca în grupele bune, să nu ne întrebe de secțiuni frontale, sagitale și orizontale, ci de secțiuni oblice - mult mai complicate, ca să ne surprindă dacă știm bine anatomie topografică. Ei bine, am ezitat toți. Am dat eu un răspuns; mi-a răspuns cu un zâmbet care însemna că e bine. Dr.Oghină mi-a spus că a fost foarte bine.

Dr. Oghină ne povestea că era, după părerea lui, cel mai important anatomist pe care l-a cunoscut de la Prof. Rainer și Gr.T. Popa. Cursurile pe care le-am audiat au fost fascinante. El venea la cursuri fără hârtii, fără notițe și rareori folosea niște planșe. Se excela pe vremea aceea prin planșe. Avea niște cursuri de o claritate de cristal. Era o transmitere de noțiuni care nu aduceau nici un cuvânt în plus.

Dar, ceea ce ne impresiona pe noi, era plasticitatea exprimării și mai ales plasticitatea exprimării în grafică, în desen, a ceea ce voia să spună despre niște structuri foarte complicate. El o făcea în 2-3 scheme, toate într-un concept bine cunoscut al morfologiei funcționale așa cum o concepea Prof. Rainer și căruia, din acest punct de vedere și din altele, i-a fost în continuare credincios. Morfologia și anatomia este știința formei vii. El explica totul fără emfază, cu distanțare, cu o siguranță, cu o precizie și cu o convingere, față de care, noi nu aveam replică evident, dar mai erau și alții care puteau să aibă eventual o replică (mai erau desigur și alți profesori în Facultatea de Medicină). Acest element făcea ca la sfârșitul cursului noi să fim entuziaști, într-adevăr, uneori aplaudam, alteori nu, pentru că, adesea, după terminarea cursului, noi ieșeam afară în pauză și ne apropiam de dânsul și stătea de vorbă cu noi ori de câte ori era posibil.

Cursul pe care-l preda nu se observa că era pregătit dinainte. Bineînțeles că era pregătit, dar noi nu vedeam acea pregătire. Venea parcă la o discuție între colegi. De altfel distanța dintre catedră și noi, deși ni se părea așa de mare, din punctul nostru de vedere, el cred că nu o vedea, el era printre noi, încerca să ne transmită toate convingerile sale. Calitatea aceasta a cursului era extraordinară.

Tot în această perioadă din facultate am participat, fără să vreau, la un eveniment trist și semnificativ în același timp, din viața prof. Simionescu. Eram în biroul organizației de tineret (responsabil profesional), ceilalți erau membri de partid, eu nu eram încă. Am fost chemați la partid într-o zi, ni s-a pus un text în față, de către secretarul nostru de organizație, Savelciuc, spunându-ne că trebuie să semnăm acest material pentru că așa a zis tovarășul secretar de partid. Tovarășul secretar de partid era tot anatomist, unul din concurenții Prof. N. Simionescu la postul de conferențiar. Nu-i dau numele, el are un nume, dar de fapt este fără nume, chiar dacă acum se află în Germania… Acest text trebuia să-l semnăm și noi studenții, ca un argument de susținere a secretarului de partid, împotriva prof. Simionescu.

Ceilalți din birou au semnat în mod automat, eram niște copii, vă puteți imagina. Să nu credeți că eu am fost mai isteț, dar ceva mi se părea că este în neregulă. Cer permisiunea să citesc materialul înainte de a-l semna, evident că voiam și eu să-l semnez, nu puteam să ies din "front". Când am citit textul, pot să spun că m-am îngrozit , erau nedreptăți crase, din care rezulta, că prof. Simionescu este "cosmopolit". Cei mai tineri de astăzi nu-și pot da seama ce rezonanță avea termenul acesta în anii aceia. Însemna a fi vândut occidentului. Și argumentele pentru aceasta erau în principal două. Două erau lucrurile acuzatoare: unul mai puțin important, că vine la cursuri cu pantalonii strâmți (era o modă atunci și dânsul, așa era, venea impecabil îmbrăcat, cu o ținută superbă și asta impunea de la început), iar a doua observație, care îl încadra pe dânsul, în ceea ce se chema "opoziție", că în toate cursurile pe care le prezenta în fața noastră se menționau numai autori occidentali. Lucru absolut inexact. Eu observasem ceva, dar nu mi-am dat seama până atunci. Prezenta cursul din ziua respectivă, dar întotdeauna pe tablă, în dreapta punea autorii occidentali, iar în stânga scria conștiincios, autori sovietici. O dată, mi-aduc aminte, cred că nu greșesc, l-a scris chiar cu litere chirilice pe unul dintre ei. De ce a făcut-o așa, nu știu. Faptul acesta l-am mai verificat controlând cursurile mele ulterior, era un fapt real, deci dădea totdeauna și autori ruși și autori occidentali, aproape la fiecare curs.

Mărturisesc că l-am bănuit că o face cu ostentație (să nu mă credeți că eram un vizionar), era prea evident că în dreapta erau unii și în stânga erau ceilalți... Dar acum, când am văzut acest material, m-a revoltat chestia aceasta, și i-am spus secretarului de partid, că nu este adevărat, "vă arăt cursurile mele". „Dacă dumneata nu vrei să semnezi, nu semna și poți să pleci". Nu vreau să vă mai rețin atenția și să mai spun ce a urmat după aceasta pentru mine. N-am semnat și chiar după aceea, concursul

a avut loc, nu știu exact cum s-a desfășurat. Secretarul de partid a ajuns undeva pe la stomatologie, conferențiar, fapt este că la examenul pe care l-a dat seria noastră, a fost o tensiune extraordinară, din cei 7 care eram în birou, 5 au „picat", cum se spune (examenul se dădea cu prof. Riga, prof. Repciug și cu dânsul proba practică, erau probe de dimineață până seara). Unul a luat 5, iar eu nu știu cum s-a întâmplat, eram mai la urmă, am leșinat, pur și simplu. Și m-am trezit în fața dânsului. "Ce-i cu tine, Popa? Ce s-a întâmplat? Ai scris ceva acolo?" A citit cu atenție 2 minute, cred că nu mai mult, și după aceea mi-a dat drumul și mi-a spus să mă odihnesc. Mi-a dat nota 10. Nici acum nu știu dacă această notă de 10 mi-a dat-o pentru ca leșinasem, sau mi-a dat această notă pentru că probabil auzise ceea ce făcusem eu, într-o notă discordantă (fară a mă lăuda pentru că nu eram conștient de ce fac la momentul acela; eram totuși singurul din acel birou care am îndrăznit să nu semnez un document care era împotriva lui pentru niște lucruri neadevărate). După ce s-a întors din America, i-am povestit acest episod, s-a amuzat putin, "cred că l-am și uitat", mi-a zis dânsul.

O altă întâlnire din vremea aceea, a avut loc pe bulevard. Eram pe la Casa Armatei. M-a invitat să bem un suc (pe vremea aceea se servea suc cu sifon pe bulevard) și de acolo pâna la facultate am parcurs drumul împreună. Așa de fascinantă a fost discuția cu dânsul, aveam senzația că discutam cu un frate mai mare, care are grijă de mine și care se preocupa de mine fară să fie neapărat deasupra mea sau înaintea mea în demersurile sale. La facultate mi-a spus un singur lucru: "Ai grijă, tu te comporți cam riscant…". Poate era o aluzie la ceea ce se întâmplase anterior.

După ce s-a întors din America, m-a rugat să-l văd (eu ocupându-mă de neurologie) pe Prof. Tașcă, un cunoscut al lui, apropiat al lui, care a făcut un accident vascular. Și l-am vizitat. După ce am discutat împreună, într-o fracțiune de secundă, amândoi am ajuns în același loc, la aceeași concluzie. Și la sfârșit, în birou la mine, i-am spus părerea mea și mi-a spus că înțelege, știe ce va urma. Și într-adevăr așa a fost, cum a presupus dânsul. Este mare diferență spunea, între ceea ce putem obține pe animale și ceea ce se întamplă la om. Totuși pentru o parte din procesele care se întâmplă la om, studiul experimental pe animale, o dată și o dată va putea să rezolve și aceste probleme. Era vorba de o ocluzie de carotidă, era vorba de procesul de aterogeneză, de toată discuția cu privire la endoteliu ș.a.m.d. pe care am purtat-o o oră și ceva la mine în cabinet. Într-un colț aveam o carte a dânsului de anatomie. "Ce mai ziceți, domnule Profesor de cartea aceasta"? "Ei, asta nu mă mai interesează acum", era o carte de anatomie pentru disecție.

Încă un moment, care spune câte ceva despre această imensă personalitate umană a prof. N. Simionescu. Făceam atunci un fel de învățământ "teribil" de partid, pentru cei care erau cadre de conducere. Cum bine știți mai toți de aici, veneau pentru această formă de învățământ, o categorie de oameni cu pregătire superioară: filozofi, unii membrii ai Academiei. Dânsul participa ca director de institut, eu eram tânăr prorector

ştiinţific pentru o perioadă scurtă de timp. Eu am intrat în discuţie cu freudismul şi neofreudismul şi cu asta am încurcat lucrurile pentru că doar un singur profesor din sală ştia câte ceva despre asta, ceilalţi habar nu aveau. Dânsul venise cu diapozitive şi a cerut permisiunea să-şi expună punctul de vedere. Toată prezentarea dânsului se referea la Institut, la ce s-a realizat în Ţara Românească şi mai ales la lucrările făcute cu Palade, într-o prezentare pe înţelesul tuturor acelora care nu aveau de-a face cu medicina. Niciodată nu l-am auzit vorbind într-un mod echivoc, într-un cadru în care, de multe ori, erai obligat să vorbeşti într-un anumit fel. Acesta era profesorul Nicolae Simionescu, cel care a reuşit să depăşească vremurile, a reuşit să se ridice deasupra existenţelor şi să facă ceea ce avea înlăuntrul lui de făcut, cu ambiţia, cu tenacitatea şi mai ales cu un creier extraordinar, pe care îl consider unic.

Rugându-mă să-i examinez nişte rude din familie, din Bucureşti, din zona Tei, am văzut atâta comprehensiune şi atâta camaraderie, aş putea spune, în mulţumirile sale pentru ceea ce am putut şi eu să fac la momentul respectiv. Nu s-a îndoit nici o clipă că ar mai fi nevoie de cineva care să-i vadă, deşi erau nişte probleme de mare dificultate; din partea rudelor am văzut un fel de sublimare sentimentală extraordinară, în adoraţie şi mulţumiri pentru că cel care de acolo de sus (aşa îl vedeau dânşii pe Prof. Simionescu, şi aşa îl vedeam şi eu), s-a gândit să le vină în ajutor. Toate aceste lucruri le facea cu o delicateţe, şi cu o apropiere încât devenea aproape dezarmantă orice intervenţie.

Am asistat împreună aici la o întâlnire cu profesorul Poenaru; impresionantă această întâlnire la care am participat cu foarte multă plăcere şi atunci credeam că acele momente nu se vor sfarşi niciodată. Încercând să contribuie la o destindere în timpul unei prezentări cu rigori ştiinţifice, la un moment dat, Prof. Poenaru trece rapid din limba română, în engleză, franceză, germană şi rusă, revenind apoi în limba română. Răspunzându-i colegial, parcă pentru a împrăştia un eventual ,,echivoc", Prof. Simionescu i-a răspuns în limba japoneză...

Nu credeam că vor veni evenimente care să facă să regretăm că asemenea lucruri nu mai sunt posibile. In acea prezentare, de care o parte va amintiţi, am văzut un fel de gingăşie spirituală implantată într-o sobrietate unică a profesorului Simionescu, unică zic, şi specială pentru că această sobrietate specială apropie totul de valoare şi depărtează (fără cuvinte) non-valoarea. Aşa era el, avea un tactism pentru cei care au valoare şi era limpede că cei care n-au valoare n-au ce căuta pe lângă dânsul - fără prea multe cuvinte.

Am fost în Bucureşti când s-a spus că profesorul Nicolae Simionescu a fugit în America şi era în Universitate o discuţie pe tema aceasta. Am fost martorul unor discuţii. Niciodată, chiar şi cei care nu aveau habar de medicina din Universitate, nu l-au contestat pe acest om ca valoare profesională. Desigur că au făcut comentarii că rămâne în America şi nu se mai întoarce. Au regretat foarte mulţi din colegii care l-au

cunoscut și mai ales cei de la Institutul Parhon și nu numai, iar noi studenții, care nu mai eram de mult studenți, eu unul dintre ei, ne-am bucurat, sincer vă spun, pentru că am presupus și așa a și fost, că numai acolo se putea realiza un om de asemenea valoare.

Surpriza mare a fost, că și atunci când s-a întors, o parte l-au aplaudat, iar o parte l-au invidiat. Noi îi simțeam pe acești oameni periferici și simțeam cine este profesorul Nicolae Simionescu. Nu este adevărat că el era concentrat numai aici în institut, toată lumea știa cine este profesorul Nicolae Simionescu. E adevărat că, dacă cineva l-ar fi lăsat să se desfășoare, în timpul perioadei cât a fost profesor la Universitate, în domeniul umanistic-cultural, ar fi fost și mai frumos pentru noi, tinerii de-atunci, să vedem și celelalte fațete pe care dânsul le-a avut și le-a exprimat într-un mod sau altul.

I.T. Niculescu, spunea odată că "a trăi în sufletul și idealurile elevilor este o formă de nemurire, care înalță pe om mai mult decât propria sa operă științifică". Nu știu dacă e chiar a lui I.T.Niculescu această formulare, dar mi-a placut totdeauna, i se potrivește profesorului Nicolae Simionescu. Eu nu pot pretinde a fi elevul său. Am fost un elev al său în școala "primară" și probabil că acest model m-a ajutat să fac ceva ,daca am făcut ceva. William James spune că "mai ușor se reușește prin exemple, decât prin îndemnuri". Prof. Simionescu este tipul de om de știință, tipul de creator, ființa umană aproape enciclopedică, sigur enciclopedică, dar dacă ne referim la realizările sale științifice, ele se concentrează foarte mult, cum era normal, pe domeniul biologiei si patologiei celulare; dar un om, un alt om de știință de o asemenea complexitate, eu nu cunosc.

Închei cu ceea ce spunea la un moment dat Gabriel Liiceanu într-o lucrare a sa; vorbea de faptul că fiecare om își construiește de-a lungul vieții un "edificiu afectiv". "Fiecare om sănătos cu o pregătire mentală normală și cu o pregătire culturală normală, fiecare om există, continuă să existe, supraviețuiește, apărându-se prin acest "edificiu afectiv" din care fac parte cei apropiați, prietenii, oamenii de știință, profesorii care sunt în viață, care nu sunt în viață, oricine altcineva care te sprijină, te ajută să continui să exiști și să faci ceva. Fară acest edificiu afectiv, nu poți continua, nu poți exista, nu poți să faci nimic".

Sunt fericit să vă spun că profesorul Nicolae Simionescu face parte din edificiul meu afectiv chiar dacă dânsul nu o știe.

PREGĂTIRI DE LANSARE

DR. CONSTANTIN NEACȘU
Primul Director Adjunct al
Institutului de Biologie și Patologie Celulară

Sigur, începuturile acestui institut sălășluiesc în inima celui care a rămas pentru noi: Profesorul. Și chiar dacă astăzi, fizic, nu este aici, spiritul lui veghează asupra acestui sălaș al științei așa cum și l-a imaginat și pe care sper că urmașii să nu-și precupețească eforturile pentru a-l menține la valoarea pe care dânsul i-a conferit-o. Așadar la început a fost un Om care avea carisma cercetării și dăruirii totale în această viață. El a avut firesc două mâini: una dreaptă - Maya și una stângă care, la un moment dat, am fost eu.

Profesorul s-a zbătut ca această clădire să se nască așa cum o concepuse. Am preluat acest deziderat creator încă de la începuturi, adică în anul 1976, când m-am alăturat gândurilor sale privind această frumoasă și unică realizare pe tărâmul românesc. Inițial, acceptat de conducătorii vremii ca Centru de Cercetare, pe măsura consolidării perspectivei sale științifice, ca formator de cercetători în ale biologiei celulare, s-a impus firesc ca primul Institut de Biologie și Patologie Celulară. Planurile au fost desenate de Nicolae Simionescu până la detaliul scaunului de lucru și locul fiecărui aparat din laborator pentru asigurarea unui anume flux al cercetării. Când mi le-a arătat, am fost pur și simplu captat de ideile sale, de condițiile deosebite pentru cercetare de metodologia formatoare a cercetătorului tânăr în domeniul atât de evident interdisciplinar al biologiei celulare.

Din 1976 am supravegheat permanent lucrările de lucrările de construcție. Legătura cu Profesorul se făcea printr-o permanență telefonică cu SUA, unde soții Simionescu lucrau la transplantul științific al cercetării celulei endoteliale în țara noastră. Proiectul a fost realizat după schițele Profesorului la Institutul de Proiectare al Ministerului Educației de către remarcabilul arhitect Antonescu și de către inginerul constructor Constantin Buzdugan. Lucrările au demarat cu Grupul de construcții 8, dar ca urmare a nemulțumirilor raportate împreună cu ing. Petruc, din partea noastră, a beneficiarului, am terminat cu Grupul de construcții 5. Am urmărit zi de zi desfășurarea lucrărilor (luându-mi un concediu din activitatea științifică) împreună cu

ing. Teodor Petruc, astăzi și el plecat dintre noi, ca și arhitectul Antonescu.

In 1977, când cutremurul din 4 martie a zguduit orașul, clădirea ajunsese la primul etaj. Prin hotărârea guvernamentală, se opresc lucrările la noile construcții, pentru a se trece la consolidări. Prin demersurile făcute pe plan local, prin eforturi de culise, am stabilit ca această clădire să fie considerată de „amploare medie" pentru a putea fi continuată. S-au ridicat ziduri, s-au dărâmat ziduri până s-a înțeles că această construcție trebuie să iasă perfect.

Îmi revin în minte unele trăiri ale momentului, acum când în ceața timpului scurs, aproape un sfert de secol, s-a consolidat doar nostalgia. Într-o zi, maistrul șef, care simțea că nu-l pierd din ochi, îmi spune "Tovarășe doctor, mă întreb dacă ați făcut instructajul de protecția muncii?" La răspunsul meu negativ, mă avertizează că mai poate cădea câte o cărămidă, se mai poate dezmembra câte un element de la o schelă sau mai știi ce alte accidente. Replica a sosit la ședința obișnuită de sâmbătă, ce avea loc în prima cameră terminată de la parter, actualul sediu al serviciului economic, așa zisul comandament de analiză a lucrărilor împreună cu beneficiarul. Atunci l-am îndemnat pe șeful șantierului care stătea alături de mine să arunce o privire zidului în care era montată ușa. Observând evidenta diferență de verticalitate de aproximativ 20 cm, ing. Stefănescu i-a cerut tocmai acelui maistru șugubăț să mai dărâme un zid. Trec peste acoperirea a șase perforații din dreptul culoarelor de trecere, ce nu fuseseră șterse din planurile proiectanților după unele modificări, ca să mă opresc la un aspect mai pitoresc care probabil a trebuit să rămână ca un stigmat al constructorului într-o clădire. L-am botezat "cuiul lui Pepelea" și se află la etajul trei, la sala de operații animale, pe peretele din stânga și constă într-o bucată de fier beton care iese din zid, fără să acopere nici o utilitate și care a fost ocolit cu grijă de faianțar și vopsit în culoarea camerei. Tot în acel an, 1977, se ajunsese la etapa placării laboratoarelor cu faianță de culori diferite pentru fiecare nivel. Acest deziderat important era pe cale de a nu se mai efectua, după ce constructorul ne anunțase că producția de faianță colorată fusese periclitată de cutremur. Prin profilul meu de medic endocrinolog cu activitate în domeniul oncologic, am obținut redistribuirea unei cote de faianță colorată, atât cât aveam nevoie și care mai este și astăzi în clădire.

In 1978, profesorul Zarnea, directorul general al Institutului Central de Biologie, s-a pomenit cu o adresă de la Ministerul Educației prin care era pus în situația de a "înfia" pe schema sa, temporar, încă un director adjunct, în persoana celui care vă vorbește. Era momentul în care se desfășura activitatea de constituire a decretului de înființare a Institutului de Biologie și Patologie Celulară. În cursul acelui an, 1978, odată cu etapele de finisare a construcției, a preluării spațiului de lucru cameră cu cameră, a primirii aparaturii de cercetare: microscoape Philips de ultimă generație, ultracentrifugi de înaltă performanță, camere frigorifice și ele ultimul tip și a sticlăriei a început forfota amenajării spațiilor de lucru. Microscoapele electronice au venit

într-o geroasă lună de iarnă, și deși ambalate de fabricant, pentru că o perioadă au trebuit să rămână în curte, am simțit la unison nevoia să le protejăm în plus: ne-am scos toții hainele de iarnă și le-am pus peste cutiile cu microscoape. Era grija adevăraților oameni de laborator pentru prețioasele lor jucării. A fost o trăire sinceră, iar pasiunea profesorilor Simionescu a fost repede captată de primul grup de cercetători și tehnicieni la acel moment de început.

În septembrie 1979, Profesorul și Maya erau în țară și trebuiau să prezinte noul institut atât în lumea științifică românească, cât și internațională. Invitați de peste hotare, personalități marcante și laureați ai premiului Nobel: Palade, de Duve, Sabatini, Farquar, Franke, Blobel trebuiau să sosească pentru inaugurării. Un mesaj telefonic ne anunță că nu se poate ține simpozionul inaugural deoarece nu avem nici o aprobare (ceea ce era adevărat, dar Profesorul nici nu a crezut firesc că ar trebui să cerem). Două acțiuni de urgență au pornit în paralel: Profesorul la Minister explica imposibilitatea de a amâna Simpozionul, noi în Institut am început să ne donăm salariile pentru 6 luni - un an, pentru a acoperi biletele de avion ale invitaților. Profesorul a învins inerția și opacitatea guvernanților vremii și în final am am reușit să-i avem pe invitați la inaugurare. A fost primul nostru mare succes. Deschiderea oficială a Institutului a marcat împlinirea visului unui temerar în propășirea științei românești. Acum Profesorul se putea apleca liniștit asupra misterelor celulei endoteliale spre a-i descoperi tainele și spre a defini fenomenul de transcitoză.

UN OM, O IDEE - SUSȚINEREA ADEVĂRATELOR VALORI

DR. DOINA VELICAN
Membru al Academiei de Științe Medicale

A vorbi despre Academicianul Nicolae Simionescu după emoționantele cuvinte rostite de distinsele personalități care l-au omagiat în această sesiune comemorativă nu poate decât să impună potrivirea mersului după urmele pașilor anteriori. Este greu să găsesc alte fraze elocvente pentru a-l evoca în această clădire unde plutește și domnește umbra sa vie. Aș putea spune că oamenii de statura sa sunt făclii care, la răscruce de drumuri, luminează toate căile care se îndreaptă spre direcții diferite.

Profesorul Nicolae Simionescu a fost deopotrivă cercetător pasionat, creator de școală, organizator de instituții. Încercând să găsesc un numitor comun tuturor acestor activități, eu l-am perceput pe Prof. Simionescu drept omul dedicat ideii de a susține și promova valorile autentice. Valorile au totdeauna timpul lor, care nu trece nici azi, nici mâine, niciodată. Profesorul N. Simionescu era din spița rară a celor care caută valorile și descoperindu-le, le deschid drumul printr-un generos efort propriu. Acest impuls și-a pus amprenta pe tot ce și-a propus și a reușit să realizeze în prea scurta sa viață. În slujba acestei idei și-a angajat puterea de gândire, o bogăție de mijloace și o mare încordare a voinței.

S-a spus despre Prof. Simionescu că a avut curaj și noroc, dar nu există vânt prielnic decât pentru cel care știe în ce direcție se îndreaptă. Prof. Simionescu a avut vocație de constructor. Se pare că acest morb l-a împărțit nu numai cu Maya Simionescu ci a fost transmis și genetic în generația mai tânără a familiei sale. O construcție durează numai dacă este solidă înglobând "structuri" de valoare autentică. În acest spirit, Prof. Nicolae Simionescu, împreună cu Maya Simionescu și ajutați de micul grup de fondatori, au creat Institutul de Biologie și Patologie Celulară care astăzi îl poartă numele.

Condus de ideea că nu există bun, ci numai cel mai bun, Profesorul Simionescu a gândit acest Institut nu ca o instituție obișnuită, normală, ci ca una de nivel comparabil cu cele mai bine cotate institute din lumea științelor biologice. Existența și evoluția dinamică a institutului probează că această creație a reușit să se lanseze în competiția mondială

generată de rapida dezvoltare a cercetărilor de biologie și medicină din ultimele decenii.

Alte două "construcții" subsumate proiectului de bază, respectiv "echipa" și "tematica de cercetare" au fost realizate tot în virtutea ideii de promovare a valorilor. Este proverbial efortul Profesorilor Simionescu de a căuta și a atrage tinerii absolvenți cei mai bine dotați și pregătiți, de la Facultățile de diverse specialități necesare pentru echipa institutului. Conștient că în viață nu ai decat atat cât dai, Profesorul Simionescu nu a ezitat să dea girul său celor care făceau dovada de inteligență și cunoștiințe solide, uitand să citească fila cu antecedente personale și familiale. Chiar în împrejurări neprielnice a depus eforturi susținute de a deschide drum celor care într-adevăr meritau să fie susținuți și cărora le-a stimulat creativitatea, spunand unor înalte exigențe.

Alegerea proiectelor de cercetare s-a situat pe aceeași orbită de căutare a valorii autentice. Institutul a propus totdeauna proiecte de amplă respirație și mare actualitate, competitive cu cele lucrate în importante centre de cercetare din comunitatea științifică internațională. Au fost astfel obținute rezultate remarcabile prin continuarea studiilor asupra endoteliului și altor structuri vasculare, asupra interacțiunilor celulare și moleculare în bolile cardiovasculare, în farmacologia celulară ș.a. Înzestrat cu o gândire efervescentă, alimemtată prin studiu neîncetat, Profesorul avea talentul de a coborî cu ușurință din sfera gândirii către lumea realității, pentru a închega în idei noi bogata varietate a faptelor.

O altă construcție a Profesorului Simionescu este Societatea Națională de Biologie Celulară, creuzet în care s-au contopit energiile adunate din toată țara și din toate disciplinele asociate, pentru a da o structură solidă, încorporând aceleași principii de exigență și stimulare a valorilor. În acest context nu pot să nu amintesc memorabilele ședințe de Consiliu în care, Profesorul Simionescu, cu discreție și tact, veghea ca aceste principii să fie strict respectate. Și în sfârșit, last but not least, trebuie subliniat rolul Prof. Nicolae Simionescu în organizarea secției de Științe Biomedicale a Academiei de Științe Medicale. Am amintiri de neuitat din anii imediat după 1990, cand întrunirile de organizare, ținute sub conducerea sa, se prelungeau ore în șir, căutând să se stipuleze noi și noi criterii de evaluare a contractelor propuse sau de primire de noi membri, criterii care să ridice ștacheta exigențelor și impunerea valorilor reale.

Se consideră că o carte este bună dacă a spus tot ce trebuie despre subiect, dacă a spus numai ce trebuie și dacă a spus cum trebuie. În fața acestor dure exigențe, greu de îndeplinit când se vorbește despre o personalitate atât de complexă cum a fost Profesorul Nicolae Simionescu simt că este momentul să închei.

Dacă îl credem pe Seneca (și de ce nu l-am crede) viața este ca o poveste: ceea ce contează nu este lungimea, ci valoarea ei. Academicianul Nicolae Simionescu a dispărut, căci a trebuit să plătească birul neînduplecat al naturii: a lăsat însă în urmă o mare dungă

de lumină. Zilele trec greu, anii trec repede. Și toate generațiile viitoare de cercetători din acest institut sau din alte locuri vor întâlni mereu numele Prof. Simionescu atașat de tot ce a gândit și a făptuit, de toate valorile pe care le-a susținut cu generozitate.

Cu speranța că amintindu-ne de cei care au fost, pot fi încurajați cei care vin, vă rog să-mi permiteți să aduc Profesorului prinos de recunoștință pentru că, în lungul drum spre eternitate, s-a oprit o clipă, acum și aici, alături de noi.

Requiescat in pace.

PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU – CREATORUL ŞCOLII ROMÂNEŞTI DE BIOLOGIE CELULARĂ ŞI MOLECULARĂ

DR. ANCA SIMA
Institutul de Biologie şi Patologie Celulară
"Nicolae Simionescu"
Membru Corespondent al Academiei Române

Invincibil, primul în tot ce făcea, interesat în toate, cu un umor sclipitor, unic... şi totuşi atât de apropiatul nostru "domn' Profesor". Calităţile lui de om complet impuneau sentimente de respect, de devotament, precum şi de firească admiraţie. O parte din fiecare dintre noi parcă s-a destrămat odată cu trecerea lui în veşnicie. Marile lui calităţi de om de ştiinţă, de pedagog devotat, de inegalabil spirit organizatoric i-au permis să se impună cu prestanţă în literatura biomedicală mondială, şi să creeze Institutul de Biologie şi Patologie Celulară (IBPC), model de probitate ştiinţifică, de şcoală românească de prestigiu şi de promovare a unei ştiinţe impregnate de umanism.

Anul 1981 - a doua sesiune ştiinţifică anuală a IBPC - domnul Profesor deschide lucrările:

„Această sesiune ştiinţifică, în care prezentăm cu sfială unele din rezultatele noastre, o dedicăm ideii că cercetarea fundamentală în biomedicină este, prin obiectul ei OMUL, cea mai aplicativă dintre cercetări, deoarece se adresează OMULUI, nu numai ca fiind pateticul nostru CAPITAL, dar neîndoielnic UNICUL PRODUCĂTOR AL ORICĂREI ALTE CERCETĂRI".

Observaţi cum omul de ştiinţă român însumând cele mai multe citări în lucrări internaţionale de specialitate prezintă „cu sfială" rezultatele cercetărilor.

Domnul Profesor ne-a cucerit pe toţi prin modestie şi onestitate, prin francheţe şi căldură, maniera elegantă de a-şi trata colegii de toate vârstele, spiritul deschis şi elevat, distincţia cu totul deosebită. În anii cei mai sumbri ai dictaturii, sub vremi caracterizate de o scară de valori răsturnată şi de o criză fundamentală de modele, domnul Profesor a fost pentru noi toţi, elevii lui, un model şi un adevarat "antrenor"

care ne-a ținut activi, ne-a stimulat inteligența și ambiția, ne-a susținut realizările; a fost și va rămâne atât pentru noi, cât și pentru multe alte generații de tineri un simbol al tenacității și puterii de a crea prin muncă valori universale. Ne-a lăsat o amintire care ne însoțește, ne luminează, ne încălzește și susține în clipele când ne căutăm rațiunea de a fi.
Profesorul George E. Palade, laureat al Premiului Nobel pentru medicină spunea: ***"În decada 1980, Nicolae şi Maya Simionescu au ajuns să fie recunoscuți pe plan mondial ca lideri în cercetarea endoteliului vascular şi IBPC a ajuns să fie unanim considerat ca un important centru de avangardă în acest domeniu. Ambele poziții au fost consolidate în continuare de cercetările modificărilor incipiente care afectează peretele vaselor mari, susceptibile de a dezvolta leziuni ateromatoase.***

Cel mai important semn al recunoaşterii mondiale au fost cele trei granturi (de-a lungul a 9 ani) acordate de National Institute of Health pentru IBPC, la solicitarea lui Nicolae Simionescu. Au fost primele şi singurele granturi acordate unui institut de cercetare din Europa de Est, într-o perioadă în care granturile acordate unor institute din afara SUA reprezentau doar un foarte mic procent din total. Aceste granturi au făcut posibilă achiziționarea de reactivi şi echipamente de pe piața vestică şi organizarea de simpozioane internaționale in IBPC pe teme de interes general în biologia endoteliului, inclusiv transcitoza proteinelor şi lipoproteinelor şi rolul lor în dezvoltarea leziunilor aterosclerotice. La aceste conferințe au participat cercetători americani de înalt prestigiu din fiecare domeniu menționat mai sus. Americanii au fost plăcut surprinşi să constate că în realitate ei au învățat mai mult de la cercetătorii români decât cercetătorii locali de la ei. Asta nu se întâmplă deseori in lume; rezultatele se datoresc felului în care a fost organizat acest institut si principiilor lui de funcționare."

Evaluarea statistică a rezultatelor între anii 1980-1995 arată că echipa de la IBPC, inspirată și condusă de profesorii Maya și Nicolae Simionescu, a publicat 30 de capitole de carte și peste 100 de articole la prestigioase edituri și reviste din străinătate (SUA, Canada, Anglia și Germania) și a participat cu comunicări la peste 35 congrese și simpozioane internaționale.

Calitativ (ceea ce este adevărata măsură a cercetării), în IBPC s-a demonstrat pentru prima oară: (a) conceptul de transcitoză, termen dat de Prof. Nicolae Simionescu (asociat transportului transendotelial prin vezicule plasmalemale) și transcitoză mediată de receptori; (b) permeabilitatea endotelială variază de-a lungul întregului arbore vascular, precum și la nivelul unei singure celule endoteliale; (c) celula endotelială prezintă receptori pentru albumină pe care îi folosește în transportul transendotelial al acestei proteine; (d) receptorii pentru histamină sunt concentrați în special în venule - spre deosebire de arteriole și capilare - explicând topografia predominant venulară a creșterii permeabilității vasculare în inflamație (un fenomen

care i-a intrigat pe patologi aproape un secol); (e) primul moment detectabil în ateroscleroză este acumularea lipoproteinelor modificate în subendoteliu.

Directorul Institutului Pasteur din Paris, Maxime Schwartz, afirma despre Profesorul Nicolae Simionescu:
"A fost un strălucit om de ştiinţă, de reputaţie internaţională, care a adus o importantă contribuţie la cunoaşterea modernă a celulei. Domnul Simionescu, pe care am avut ocazia să-l cunosc personal, a fost un remarcabil organizator şi un animator entuziast al cercetării ştiinţifice". Pentru România, aceasta s-a tradus în organizarea şi conducerea între anii 1982-1995 a Societăţii Naţionale de Biologie Celulară (SNBC), care a devenit extensia micuţului nucleu de cercetare din IBPC, transformându-se în şcoala românească de biologie celulară şi moleculară.

Anul 1989, anul culminant al prigoanei ceauşiste îndreptate mai ales împotriva culturii şi ştiinţei; în IBPC se organizează, la iniţiativa şi sub organizarea Profesorului Nicolae Simionescu, comemorarea Eminescu. Au luat atunci cuvântul profesorii Zoe Dumitrescu Buşulenga, Mihai Dragănescu şi sculptorul Ovidiu Maitec, creatorul bustului lui Eminescu; au participat numeroşi oameni de cultură care au umplut până la refuz auditoriul Institutului.

În deschidere, domnul Profesor a explicat de ce se comemorează Eminescu într-un institut de cercetare:

„De la crearea lui, Institutul nostru a fost o instituţie de cultură în care se lucrează ştiinţă. Această concepţie are la bază două idei general acceptate: 1) ştiinţa este parte a culturii; 2) cultura înseamnă trei lucruri: creaţie, asimilare şi transmitere de valori. Cu acestea in minte, iată-ne acum zece ani, la începutul activităţii Institutului, înconjuraţi de un grup de tineri - foarte tineri colaboratori - deosebit de înzestraţi şi entuziaşti. De la început noi, cei doi seniori, am avut sentimentul responsabilităţii de a le asigura nu numai aparate, chimicale şi cărţi, ci şi condiţii pentru o formare complexă, în care să se îmbine armonios un înalt profesionalism cu o largă şi nesaturată deschidere spre mesajele perene ale culturii".

A continuat apoi, lansând un mesaj care şi azi este foarte actual:

"Să vorbim azi de o ECOLOGIE A CULTURII la care avem datoria de a participa activ pentru identificarea şi combaterea surselor de poluare şi a gravelor efecte pe care le pot avea asupra purităţii şi viabilităţii moştenirii spirituale pe care o transmitem viitoarelor generaţii. Pentru orice societate, inclusiv a noastră, progresul depinde de capacitatea de a crea "masa critică" de oameni demni, fermi şi capabili să orânduiască natural scara valorilor, împotriva poluantei non-valori. O comunitate ştiinţifică care priveşte spre viitor, inclusiv acest mic şi modest

institut, este vital interesată nu atât în a redefini "lumea ca ne-lumea" şi nici de a-i separa (aşa cum spune Eminescu) pe "smintiți şi pe mişei", ci în primul rând în a identifica, promova şi ocroti aceste realități care poartă în ele permanența spiritului şi geniului creator al poporului nostru. Asta implică să urâm apatia şi această comemorare este o luptă împotriva apatiei, pentru că aşa cum spunea un celebru gânditor "nepăsarea este treapta cea mai de jos a libertății ".

Ce alt model mai frumos şi mai viu puteam noi, tinerii din IBPC, căuta şi găsi? Ce şansă extraordinară pentru cei care l-au cunoscut şi pentru cei pe care el i-a iubit şi îndrumat în aventuri ale minții şi spiritului, în realizări ale ştiinței, dar şi autoevaluării şi autodepăşirii. Domnul nostru Profesor nu a avut timpul să ne lase un mesaj de adio. Dar cred că cele spuse la sesiunea SNBC 1989 pot fi şi acum un îndemn pentru noi toți:

„În epoca în care trăim, activitatea SNBC este o briză de cultură, un act de patriotism. Iar patriotism înseamnă în cazul nostru ştiință mai multă şi mai bună. Nu sunt vremuri simple, dar să avem un optimism activ. Şi să fim animați de sentimentul că prin această societate, împreună, am făcut să încolțească o mică floare. Şi asemenea Micului Prinț care îşi uda zilnic floricica pe care o sădise pe Mica lui Planetă, şi noi să îngrijim floarea noastră în năzuința că va deveni perenă. Şi nu numai să o îngrijim, ci şi s-o protejăm, pentru că aşa cum spunea anticul Ovidiu: fericit cel ce cutează să apere cu putere ceea ce iubeşte. Vă doresc cutezanță, putere şi mult succes".

La 6 februarie 1995, Profesorul Nicolae Simionescu a trecut din plină activitate, în legendă.

1980 - RECEPTORUL LA HISTAMINĂ, PRIMA VICTORIE, PRIMA CUPĂ DE ȘAMPANIE ÎN IBPC

DR. CONSTANTINA HELTIANU
Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"
Membru al Academiei de Științe Medicale

Viața este ca o poveste… Povestea receptorului la histamina a început în anul 1980. Un grup de tineri cercetători, proaspăt angajați în Institut, împreună cu Profesorii Maya și Nicolae Smionescu au început cercetările în IBPC. Printre aceste cercetări a fost și studiul receptorilor la histamină pe endoteliul vascular. Într-una din zile, Dl. Profesor Simionescu mi-a arătat o imagine dintr-o lucrare de a dânsului, care fusese recent publicată. Aceasta reprezenta un diafragm de șoarece. Animalul a fost injectat intra venos cu cărbune. După aplicarea topică de histamină pe diafragmul animalului, cărbunele din lumenul vaselor de sange a pătruns în spațiul subendotelial. Fenomenul care s-a observat prin microscopie optică, a apărut preferențial la nivelul venulelor și s-a realizat probabil datorită contracției celulelor endoteliale, care și-au deschis joncțiunile și au lăsat cărbunele să pătrundă în țesut, printre ele. Astfel, s-a observat o marcare specifică a venulelor, în comparație cu celelalte microvase, ca de exemplu arteriolele. Oare efectul histaminei, de contracție a celulelor endoteliale, se produce printr-un mecanism de receptori? Și Dl. Profesor mi-a zis: Ce-ar fi să prepari un conjugat care sa fie și electrono-opac și să conțină și histamină. Folosirea lui poate ne va da o indicație că există pe membrana endoteliului vascular receptori la histamină. Oare cum sunt ei distribuiți? Imaginează-ți că un astfel de conjugat ar putea să producă o marcare a venulelor ca și în cazul experimentului cu cărbune.

Profesorul avea un dar teribil să te facă să-ți imaginezi experimentele. Și ceea ce și-a imaginat s-a confirmat. Conjugatul histamină-feritină preparat a fost purificat, verificată puritatea și testată capacitatea de a-și păstra activitatea biologică a histaminei. Prin perfuzarea conjugatului în vasele de sange și analiza electrono-microscopică a preparatelor am obținut răspunsurile la întrebări. Da. Sunt receptori la histamină pe membrana endoteliului vascular. Aceștia sunt preferențial distribuiți pe endoteliul venular, mai puțin în capilare și aproape deloc în arteriole. Conjugatele histamină-feritină sub formă de mici agregate au produs o marcare a venulelor

asemănătoare cu cea pe care Dl. Profesor o observase anterior în experimentele cu cărbune administrat la șoarece. Ce s-a mai bucurat! A fost prima realizare din Institut, în cinstea căreia cu toții am ridicat o cupă de sampanie.

Cercetători din comunitatea științifică internațională au apreciat aceste realizări. Astfel, Profesorul Guido Majno spunea:

„Cum sunt selectate venulele? Este uşor de răspuns, folosind complexe de histamină cu feritină (care este vizibilă prin microscopie electronică), Heltianu et al. au arătat că endoteliul venular are mai mulţi receptori la histamină decât endoteliul din alte părţi ale arborelui microvascular (Cell, Tissue and Disease, 1994, 375)”.

Aceste rezultate au fost prezentate în toamna aceluiași an, 1980, la congresul internațional de biologie celulară de la Berlin (pe atunci, de Vest). Împreună cu Dl. Profesor un grup de tineri cercetători a mers la acel congres, pentru mulți din noi fiind prima ieșire din țară și prima participare la un congres științific. Și povestea continuă… și astăzi… cu alt subiect… cu alți cercetători… dar din păcate fără Profesorul nostru…

DE LA SITUSURI DE LEGARE A ALBUMINEI LA RECEPTORUL PENTRU ALBUMINĂ

DR. DOINA POPOV
Institutul de Biologie și Patologie Celulară
"Nicolae Simionescu"
Membru Corespondent al Academiei Române
Membru al Academiei de Științe Medicale

Într-o scrisoare din 1978, referindu-se la conținutul științific al Congresului Anual al Societății Americane de Biologie Celulară, Dl. Profesor făcea următoarea remarcă perfect valabilă și azi :

„Este impresionant cât de mult şi bine se lucrează. Fiecare se restrânge din ce în ce mai mult pe o sub-problemă, şi asta e valabil şi pentru întregi departamente sau institute. Altfel, tematica majoră rămâne aceeaşi, deoarece ignoranța noatră e încă atât de largă".

O astfel de sub-problemă este transportul proteinelor din plasma, prin endoteliu, spre fluidul interstițial. Pentru identificarea căilor de transport se foloseau in acea vreme trasori, substanțe chimice. Ideea Profesorilor Nicolae și Maya Simionescu a fost de a utiliza în loc de substanțe chimice, trasori fiziologici, LDL sau albumină. Perfuzand albumină adsorbită pe Au coloidal în patul vascular pulmonar s-a constatat că acest complex este preluat din lumen de veziculele plasmalemale (caveole) endoteliale și de domeniile fără înveliș ale plasmalemei luminale. In timp, veziculele ce transportă Alb-Au traversează endoteliul și, în final, complexul este descărcat către spațiul subendotelial. Procesul este specific, deoareace alte proteine (fibrinogen, fibronectină) adsorbite de Au nu decorează caveolele, iar un exces de Alb perfuzată alături de Alb-Au reduc legarea. În acest moment s-au ridicat două întrebări: 1. Acest transport preferențial are loc și în alte paturi vasculare decat plămânul? și 2. Există cumva proteine responsabile de acestă legare specifică, și dacă da, care sunt acelea?

Răspunsurile au venit relativ repede: 1. Capilarele din miocard, din țesut adipos și din microvasculatura periepididimală prezintă o legare selectivă a Alb-Au de veziculele plasmalemale. 2. Deoarece studiile de perfuzie in situ au fost realizate cu un ligand polivalent,Alb-Au, au fost imaginate experimente în care să se interacționeze un ligand monovalent, monomeri ai radioiodinați ai Alb cu o singură specie celulară, celulele

endoteliale aortice bovine. Rezultatele au arătat că legarea albuminei radioiodinate de celulele endoteliale are loc după o curbă de saturare, diagrama Scatchard aratand o valoare K_D de ordinul 10^{-12} moli, deci o afinitate mare, ce corespunde la 10^5 situsuri de legare/celulă. Datele cinetice indică o interacție puternică între Alb și celule mediată de receptori specifici.

Prof. Guido Majno aprecia că descoperirea receptorilor pentru Alb ai CE este cea mai importantă contribuție la fiziologia endoteliului de la legea lui Starling (elaborată în urmă cu 100 de ani, această "lege" arată că peretele capilarelor se comportă ca o membrană semipermeabilă, capabilă să rețină proteinele), sau mai exact de la demonstrarea transportului vezicular de către Profesorul Palade.

A început astfel un nou proiect: identificarea și caracterizarea proteinelor responsabile de legarea albuminei ("albumin binding proteins" - ABP). Identificarea ABP a fost realizată prin două tipuri de metode: ligand-blotting și immunoblotting. S-au examinat celule endoteliale din microvasculatură în care se evidențiaseră situsuri de legare a Alb, celule endoteliale aortice – pe care se realizaseră studiile cinetice -, fibroblaste implicate în catabolismul Alb, celule musculare netede care folosesc acizii grași transportați de Alb și adipocite care depozitează acizii grași. Cu excepția celulelor sanguine anucleate, toate celulele examinate exprimă prin ligand-blotting cu Alb-Au sau Alb radioiodinat două seturi majore de polipeptide ale ABP de Mr 18 și 31 kDa. Aceleași polipeptide au fost evidentiate și în extracte de inimă și în cardiomiocite interacționate cu albumina serică monomeră anionizată sau tratată cu formaldehidă. La nivelul patului vascular pulmonar experimentele de ligang-blotting au arătat faptul că legarea Alb radioiodinate de ABP decurge după un proces saturabil și competiționabil de un exces de Alb nemarcată. Experimentele de imunoblotting au constat din următoarele: proteine din celule endoteliale aortice, celule microvasculare și plămân au fost transferate pe nitrocelulză și reacționate cu un anticorp antiidiotipic anti-albumină și, în continuare, cu proteina A radioiodinată. Controalele au constat din reactie cu un IgG preimun și din competitionarea specifică a legării anticorpului în prezenta albuminei în exces. Rezultatul este identic celui obținut prin ligand blotting: seturile ABP de masă moleculară 18 și 31kDa.

Proprietățile biochimice ale ABP: rezistența la acțiunea agentilor reducători, pI 8,05 pentru 31kDa și 8,55 pentru 18kDa. A fost descifrată parțial secvența de aminoacizi ai ABP de 18 kDa: 12 aminoacizi corespund ciclofilinei, iar primii 8 au un caracter hidrofob.

Localizarea celulară a ABP. Pentru a cerceta dacă ABP este expus de membrana apicală a celulelor endoteliale, albumina a fost reacționată cu suprafața celulară cu ajutorul unui ligand bifuncțional (SASD, sulfosuccinimidil- azido salicil amido- ditio propionat), iar după fotoactivare și autoradiografie a fost evidențiată prezența

benzilor ABP, alături de două peptide oligomere. O abordare suplimentară a format-o imunoprecipitarea BAEC rodioiodinate la suprafața apicală cu un anticorp antiidiotipic antialbumină. Autoradiografia arată că anticorpul a precipitat numai proteinele ABP de masă moleculară 18 și 31 kDa. La nivel subcelular, ABP de 18 kDa a fost localizat la nivelul membranei caveolelor. La nivelul cardiomiocitelor a fost evidențiată, de asemenea, prezența ABP. Curba Scatchard indică o afinitate mare a legării albuminei de sarcolema cardiomiocitelor.

Rolul ABP. După traversarea endoteliului cu participarea ABP din veziculele plasmalemale complexele albumină acizi grași ajung în vecinătatea sarcolemei cardiomiocitelor. La acest nivel ABP funcționează ca o moleculă de ancorare complexele albumină acizi grași se disociază iar acizii grași (sursă energetică a inimii) pătrund în cardiomiocit prin difuzie simplă prin membrană sau transportati de FABP membranar. Rămâne de stabilit rolul fiziologic al ABP expus de plasmalema abluminală a endoteliului. Cercetările asupra ABP au fost continuate și în alte laboratoare din lume, din Belgia - grupul profesorului Uriel, din SUA - grupul profesorului Palade. Existenta ABP a fost demonstrată și în viruși și bacterii. ABP reprezintă astfel, un exemplu de receptor conservat pe parcursul evolutiei cu funcția unică de recunoaștere a albuminei ne-alterată.

TRANSCITOZA MACROMOLECULELOR PRIN ENDOTELIUL VASCULAR - UN CONCEPT PRELUAT DE COMUNITATEA ȘTIINȚIFICĂ INTERNAȚIONALĂ

DR. FELICIA ANTOHE
Institutul de Biologie și Patologie Celulară
"Nicolae Simionescu"

A trecut aproape un deceniu de când Domnul Profesor Nicolae Simionescu nu mai este printre noi, însă spiritul său inovator, dăruirea sa pentru descifrarea tainelor biologiei celulare și moleculare sunt încă aici, în institutul nostru, le-a sădit în fiecare dintre noi cei care l-am cunoscut, și prin noi, în noile generații de tineri cercetători care au trecut sau vor mai trece prin aceste laboratoare. Prezența sa se face simțită la tot pasul, îl regăsim în lucrările și cărțile din bibliotecă, în protocoalele de lucru din laboratoare, în amintirile noastre reflectate în numeroasele fotografii din albumul institutului, în întreaga concepție de organizare a lucrului în institut și nu în ultimul rând, în privirea pătrunzătoare și plină de forță cu care ne privește din portret.

S-a străduit să nu ne lipsească nimic ca să ne dezvoltăm și să câștigăm un loc de prestigiu în cercetarea biomedicală, așa cum părinții nu precupețesc nici un effort în educarea și creșterea copiilor. Pentru că IBPC este "copilul", creația materială și spirituală a Domnului Profesor Nicolae Simionescu și a Doamnei Academician Maya Simionescu. Ne-au obișnuit cu punctualitatea, cu corectitudinea, cu munca perseverentă și exigentă, cu spiritul de echipă si colegialitate, cu disciplina dar și cu entuziasmul, optimismul, creativitatea și curiozitatea în munca de cercetare, una dintre cele mai nobile preocupări ale omenirii.

Ne-au protejat în vremurile grele, în această oază a cercetării științifice, ne-au adus cu eforturi proprii hrana zilnică necesară unei astfel de activități, chimicalele, cărțile și revistele de specialitate necesare, prin grant-uri cu NIH USA, dar și prin donații personale deloc de neglijat, ne-au pus în mână pipeta și ne-au dezvăluit lumea minunată a celulelor, ne-au dojenit aspru când am făcut greșeli și ne-au arătat hotărât drumul care trebuie urmat, ne-au încurajat în momentele grele de disperare când rezultatele se lăsau cu greu dezvăluite și, nu în ultimul rând, ne-au învățat să ne păstrăm sufle-

tele tinere astfel încât toate obstacolele să fie mai ușor de trecut iar rezultatele și bucuriile noastre să le sărbătorim aici, împreună. Nu întâmplător la sărbătorirea a 10 ani de existență a IBPC Domnul Profesor și Doamna Maya Simionescu au primit din partea tânărului institut "Diploma pentru cea mai GRANT-ioasă activitate", reflexie a neobositei strădanii umane și științifice desfășurate în institut.

În aceste momente să ne aducem aminte cu pioasă recunoștință de Domnul Profesor, să nu-i trădăm așteptările, să ne ridicăm la înalta exigență cu care ne-a învățat și să ne bucurăm împreună de succesele noastre alături de "părinții nostri", să rămânem mereu alături, mereu împreună…. Și cum cea mai bună metodă de educație este exemplul personal, asa a făcut și Domnul Profesor, a fost primul care ne-a oferit exemplul de urmat. Unul dintre posterele prezentate la prima sesiune științifică a IBPC în 1980 era: "Transcitoza macromoleculelor prin endoteliul vascular" autor: Nicolae Simionescu. Colectivul de lucru s-a lărgit treptat și tema de cercetare propusă s-a dezvoltat generând un nou concept referitor la mecanismele de transport vezicular prin endoteliu, concept preluat ulterior de comunitatea internațională. Prin acest subiect de mare interes în cercetarea biomedicală se propunea studiul detaliat al mecanismelor de transport al macromoleculelor plasmatice prin endoteliul vascular către țesuturile subendoteliale. Endoteliul vascular, reprezentat de monostratul celular care căptușește toate vasele de sânge este un epiteliu înalt specializat în schimburile de substanțe și gaze dintre cele două compartimente lichide majore: sângele și fluidul interstițial. Experimentele efectuate sub îndrumarea Domnului Profesor și a Doamnei Maya Simionescu au evidențiat faptul că membrana plasmatică a endoteliului vascular prezintă o sarcină negativă heterogen distribuită generând o suprafață netrombogenă, dar și microdomenii lipsite de situsuri anionice. S-a observat că aceste microdomenii diferențiate din punct de vedere biochimic sunt asociate cu structuri membranare implicate fie in endocitoză (domeniile și veziculele cu înveliș), fie în transcitoză (veziculele plasmalemale, canalele și diafragmele asociate). Veziculele plasmalemale sau caveolele, fiind domenii membranare lipsite de situsuri anionice reprezintă cărăuși favorabili pentru proteinele plasmatice care sunt în marea lor majoritate anionice și sunt respinse de sarcina negativă a membranei plasmatice. Implicarea veziculelor plsmalemale în transportul macromoleculelor prin endoteliul vascular a fost postulată inițial de Profesorul George E. Palade în 1960.

În următorii ani s-au acumulat noi date și în 1979 Profesorul Nicolae Simionescu a atribuit fenomenelor de transport vezicular transendotelial denumirea de "transcitoză". Transcitoza utilizează aceleași mecanisme de bază ca și endocitoza, macromoleculele fiind transportate fie nespecific în fază fluidă sau prin adsorbție fie prin mecanisme specifice mediate de receptori prezenti pe membrana veziculelor plasmalemale. Spre deosebire de endocitoză în transcitoză purtătorii veziculari (caveolele) ocolesc compartimentele intracelulare (endozomi, lizozomi) transferând macromoleculele nedegradate în compartimentul opus în concordanță cu necesitățile țesuturilor suben-

doteliale. Numeroasele experimente in vivo, in situ sau pe culturi de celule au condus la concluzia ca veziculele plasmalemale sunt microdomenii membranare specializate. Ele au o compozitie lipidică unică și sunt lipsite de situsuri anionice puternice fiind implicate în procese majore de endocitoză și/sau transcitoză în celulele endoteliale. Acest lucru este susținut și de identificarea a numeroși receptori pentru macromolecule plasmatice, cum sunt: LDL, HDL, albumina, albumina glicată, insulina,.. și care au un rol foarte important în menținerea homeostaziei țesuturilor și a compartimentelor fluide din organism.

Conceptul de transcitoză ca și rezultatele obținute în IBPC au fost apreciate și de cercetători de pe alte meleaguri. Iată ce spunea Profesorul George Emil Palade, exprimând opinia delegației americane la sesiunea științifică 'Workshop on the Cell Biology of the Vessl Wall" din august 1983:

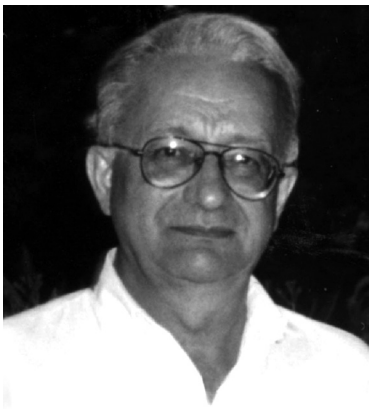
„…În momentul de față, volumul cercetărilor pe endoteliul vascular este mai important la IBPC decât în laboratoarele de la Yale University, Medical School, USA… Transportul macromoleculelor mari sau mici e un domeniu de cercetare vast… În prezent, acesta este un domeniu foarte activ de cercetare…"

La numai doi ani, când a avut loc "The Fourth US- Romanian Workshop on Biomedical Research" în mai 1985, Profesorul Palade sublinia:

„…Americanii au fost plăcut surprinsi să constate că în realitate ei au învățat mai mult de la cercetătorii români decât cercetătorii români de la ei. Asta nu se întâmplă deseori în lume. Se întâmplă rareori."

Un alt prieten al institutului, Profesorul Guido Majno, spunea atunci:
„The endothelium used to be a barrier… Let it now be …a link! Transcytosis ICBP-USA", sau altfel spus cercetarea nu are frontiere si transferul de informație și cunoștințe trebuie să reprezinte un bun al întregii omeniri.

PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU - SCHIȚĂ BIOGRAFICĂ



DR. VICTOR V. JINGA
Director Adjunct Științific al
Institutului de Biologie și Patologie Celulară
"Nicolae Simionescu"

Nicolae Simionescu s-a născut în București, la 27 iunie 1926. A frecventat cursurile liceelor "Dimitrie Cantemir", apoi "Sf. Andrei", susținând examenul de bacalaureat în 1944. Au urmat studiile de specialitate la Facultatea de Medicină din București, al cărei licențiat cu Diplomă de Merit devine în 1950. La aceeași instituție obține titlul de Doctor în Științe Medicale în 1966.

Câteva trăsături fundamentale ale personalității profesorului și savantului Nicolae Simionescu se manifestă cu pregnanță încă din tinerețe și îi marchează constant evoluția profesională: imaginația, spiritul de inițiativă, perseverența potențate de o capacitate de muncă ieșită din comun, de ordine și metodă, pasiune pentru activitatea de dascăl și de cercetător științific pentru care, potrivit spuselor profesorului G.E. Palade, "se născuse cu darurile necesare".

Între anii 1946-1970 funcționează la Catedra de Anatomie a Facultății de Medicină din București mai întâi ca preparator, asistent și, mai apoi, conferențiar și șef de departament. Concomitent își desăvârșește specializarea medicală ca extern, intern și secundar în chirurgie, până în 1957, după care, la Institutul de Endocrinologie București, desfășoară o activitate intensă de cercetare experimentală și clinică, fiind cercetător principal și șef al departamentului de morfologie (1957-1970). Din această perioadă de împliniri didactice și științifice în domeniile morfologiei, patologiei experimentale, chirurgiei și endocrinologiei datează și specializări în străinătate ca bursier al Uniunii Internaționale contra Cancerului la Institutul "Jules Bordet" din Bruxelles, Institutul "Gustave Roussy" din Paris și "National Institutes of Health", Bethesda, SUA (1968).

O mare și importantă cotitură în viața și evoluția științifică a profesorului Nicolae Simionescu este marcată de anul 1970, an în care se asociază la cercetările și activitatea didactică a Departamentelor de Biologie Celulară conduse de profesorul G.E. Palade, mai întâi la Rockefeller University, New York (1970-1973), apoi la Yale University, School of Medicine, New Haven, SUA (1973-1974).

Perioada americană și a doua perioadă românească reprezintă anii realizărilor și satisfacțiilor majore, alături de soția și colaboratoarea sa apropiată, Maya Simionescu, în domeniul biopatologiei celulare și moleculare a aparatului cardiovascular, cu o orientare specială asupra endoteliului și aterogenezei. Sunt anii afirmărilor științifice internaționale, a conceperii, realizării și conducerii Institutului de Biologie și Patologie Celulară din București, care îi poartă numele (1973-1979-1995), instituție esențială pentru dezvoltarea și afirmarea internațională a biologiei moderne din România.

Sunt anii înființării și coordonării catedrelor de biologie celulară în învățământul superior românesc, ai înființării Societății Naționale de Biologie Celulară, în 1982, al cărei președinte a fost. Sunt anii unei activități neîntrerupte și eficiente desfășurată în țară și în străinătate, cu rezultate științifice, didactice și organizatorice excepționale. Sunt descoperite și omologate apoi de către comunitatea științifică internațională (1) conceptele și termenii de "transcitoză" și "transcitoză mediată de receptor"; (2) liposomii extracelulari și lipoproteinele modificate și reasamblate, cea mai precoce modificare biochimică cu care începe ateroscleroza; (3) receptorul celular la albumină (albumin binding proteins) - în colaborare; (4) microdomenii diferențiate biochimic ale celulei endoteliale (în colaborare); (5) metode noi în biologia celulară - mordansarea cu galoilglucoza, izolarea celulelor endoteliale din inimă, noi trasori ultrastructurali de permeabilitate ș.a.

Activitatea științifică a profesorului Nicolae Simionescu a fost concretizată în peste 600 de articole originale, monografii, capitole de tratate, lucrări prezentate la congrese internaționale, apărute în străinătate, intre care 15 monografii, capitole de tratate, manuale și peste 300 articole și alte lucrări apărute în țară. Premii ale Academiei Române, ale Universității McGill din Montreal, Canada, Medalii ale unor Societăți Savante din Japonia, Canada, Franța, Italia, Austria, Grecia, precum și alegerea ca membru al Academiei Române (1990) încununează opera științifică a savantului.

A participat ca "Invited Speaker" la 24 congrese și simpozioane internaționale (SUA, Germania, Japonia, Franța, Mexic, Italia, Austria etc.) și a avut responsabilități organizatorice la 17 congrese internaționale. A fost consultant la 9 instituții științifice de mare prestigiu, printre care celebrele National Institutes of Health (NIH), National Science Fundation, Cardiology Institute of Texas din Statele Unite, Medical Research Council din Anglia, Australia și Noua Zeelandă ș.a. A fost membru a 13 Societăți Științifice internaționale, între care American Society for Cell Biology, American Thyroid Association, American Association for the Advancement of Science, International Society for Endocrinology, European Vascular Biology Association etc. și membru în mai multe colegii editoriale ale unor importante periodice străine (Thrombosis Research, Cell Differentiation, Endothelium, Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology ș.a.).

Ilustrativ pentru aspectele menționate este faptul că în "International Citation Index" - Washington, DC, SUA Acad. Maya și Nicolae Simionescu sunt autorii români cu citările cele mai frecvente în literatura internațională.

La activitatea cu caracter didactic, arătată anterior, trebuie menționate înființarea doctoratului de biologie celulară și conducerea unor remarcabile lucrări de doctorat. A susținut prelegeri de biologie celulară la peste 15 universități străine, printre care Columbia, New York; Harvard, Boston; University of California, Los Angeles; Mount Sinai, School of Medicine - New York, toate din SUA, precum și la alte universități din Japonia, Franța, Portugalia etc. A fost "Visiting Professor" și "Invited Lecturer" la peste 30 de instituții renumite de cercetare și învățământ din occident.

Perioada celor mai importante împliniri, de după 1970, a fost întreruptă brutal, neașteptat, extrem de dureros și ireparabil în dimineața zilei de 6 februarie 1995. Își asumase, în afara preocupărilor științifice și de conducere a Institutului de Biologie și Patologie Celulară, și responsabilități de mare semnificație pentru știința românească: era vicepreședinte al Academiei Române și al Academiei de Științe Medicale, președinte la Fundația Română pentru Știință, la Comitetul Național pentru Biologie Moleculară, la Societatea Națională de Biologie Celulară ș.a. Inițiase, concepuse și începuse derularea unui sistem de subvenționare prin grant-uri, menit să valorifice competența și competitivitatea în finanțarea cercetării științifice românești. Desfășura un volum enorm de muncă inteligentă, adeseori tensionată de rezistențele și inerțiile pe care le întâmpina. Conștiința faptului că avea priceperea și perseverența pentru importante îmbunătățiri ale desfășurării și conducerii cercetării științifice în România a fost suportul sufletesc pentru necruțătorul efort. Până când ...

Faptele, realizările, înșiruite incomplet și fără conotațiile emotive care să le dea căldură omenească, pot să contureze totuși, prin expresivitatea lor obiectivă, destinul și împlinirile celui care a fost profesorul Nicolae Simionescu.

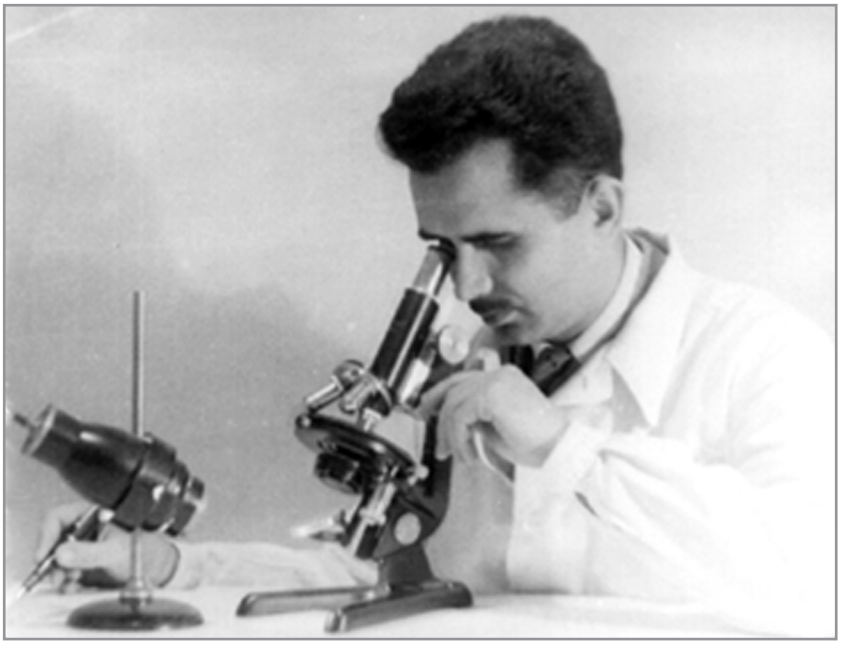
La acestea se impune menționarea unor detalii semnificative. Profesorul Nicolae Simionescu a păstrat în suflet o caldă afecțiune și a afirmat public recunoștința sa pentru maeștrii care i-au stimulat și îndrumat pasiunile și eforturile carierei științifice: profesorii Fr. Rainer, Gr.T. Popa, Șt. Milcu, G.E. Palade. Pilda maeștrilor și propriile resurse sufletești l-au determinat să fie generos ca dascăl, om de știință și întemeietor de instituții științifice.

A detestat ingratitudinea și afirmarea zgomotoasă a unui patriotism verbal; om al faptelor pozitive și al prețuirii valorilor reale umane și-a făcut cunoscută țara prin superioare performanțe științifice, înscriindu-se, în vremuri grele, în comunitatea aleasă a adevăraților patrioți și buni români.

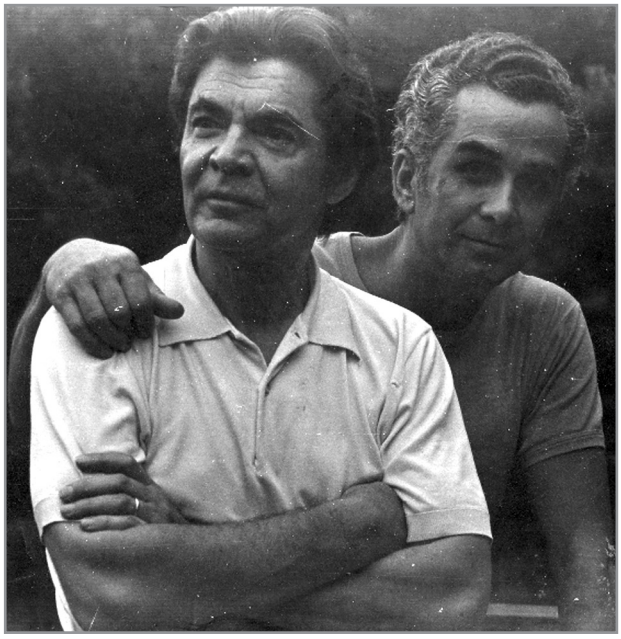
Cei care l-au cunoscut îndeaproape și i-au stat alături, păstrează în suflet amintirile despre un om inteligent, generos, curajos, răspândind în jur înțelegere omenească, grație sufletească, un farmec personal inimitabil și un superior simț al umorului. Toate la un loc au constituit o șansă, dar și obligația de a onora o prețioasă moștenire.

ALBUM
NICOLAE SIMIONESCU

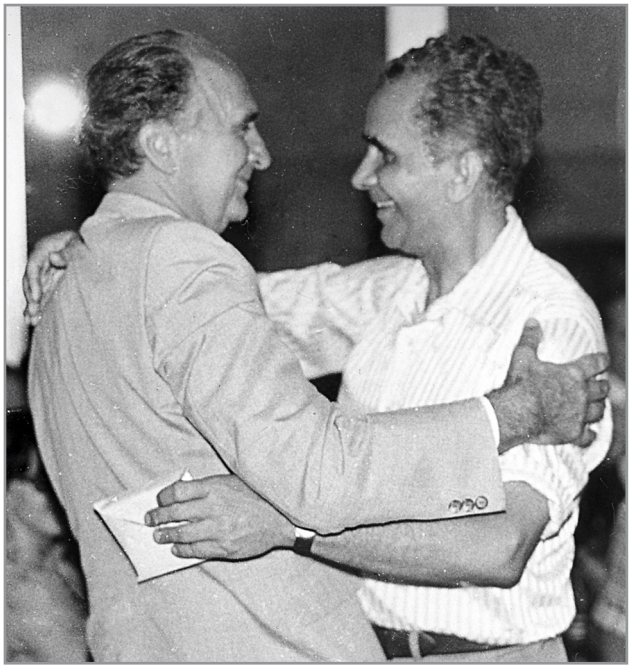
La catedra de Anatomie 1949



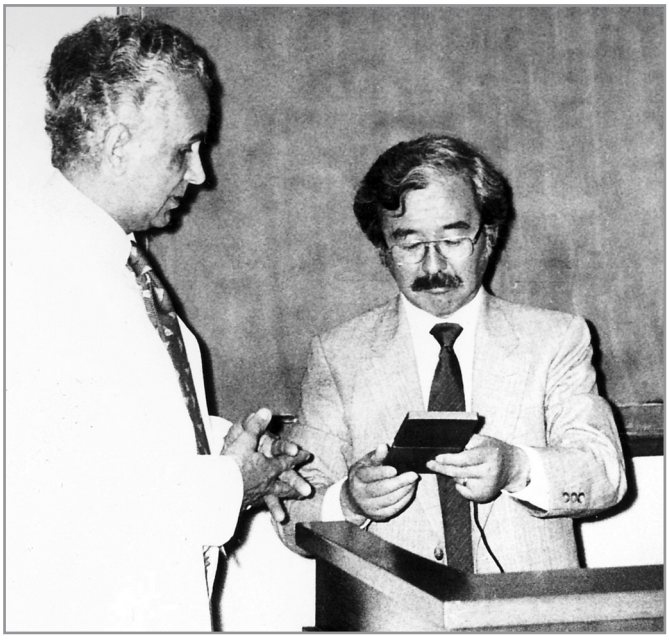
Chirurg la Clinica de Chirurgie a profesorului Ion Juvara 1950
... cu George Palade (New Haven) 1974



Acordarea premiului internațional "Louis and Arthur Lucian Award" de către Universitatea McGill, Montreal, Canada 1978



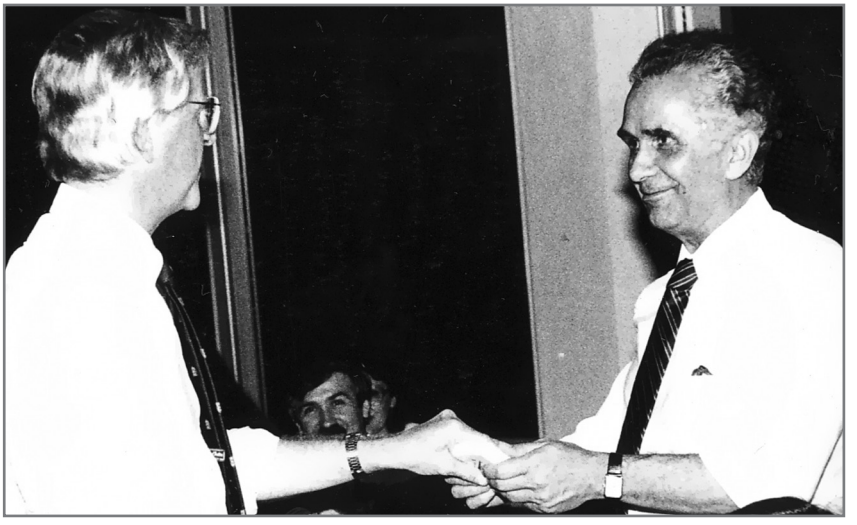
...cu profesorul Guido Majno
...cu profesorul Nakane

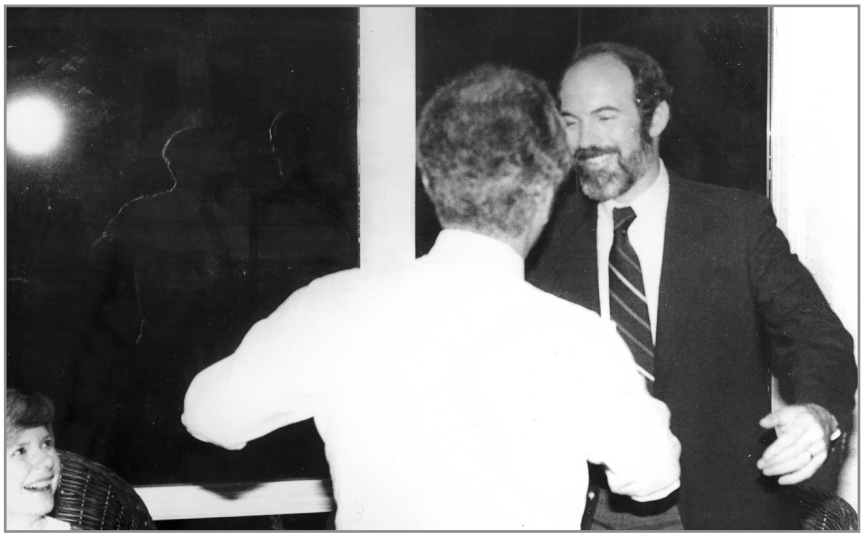


...cu profesorul Guido Majno
... cu profesorul Morris Karnovsky

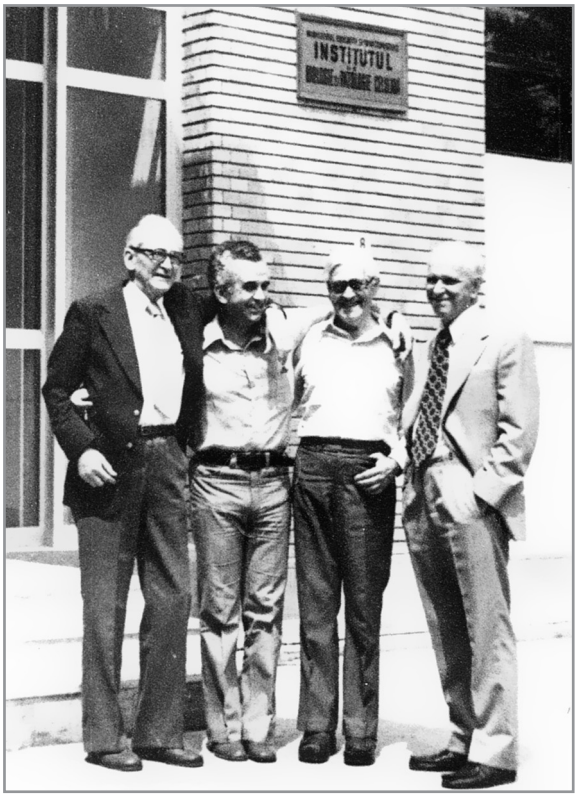
...cu profesorul Judah Folkman
...cu profesorul Gary Grotendorst

...cu profesorul Dan Steinberg
...cu profesorul James Jamieson



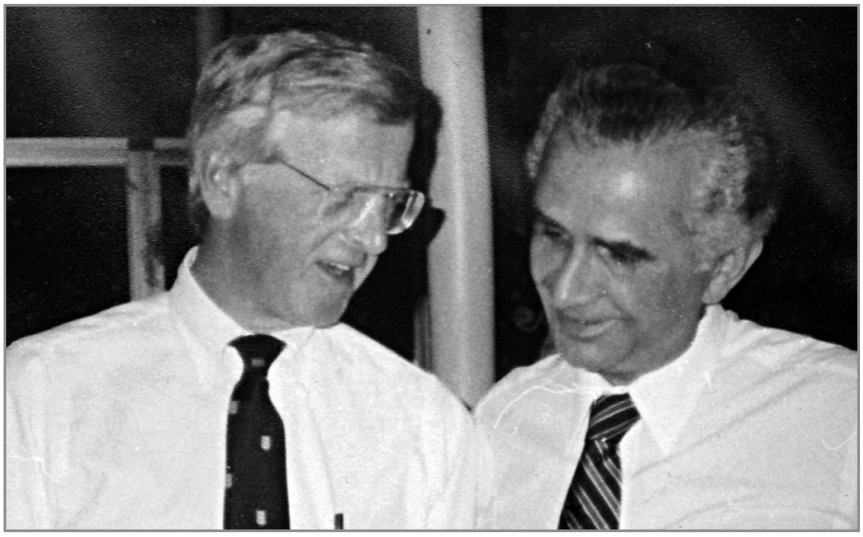


...cu profesorul Dick Anderson



...cu profesorii Ion Juvara, Gică Mănescu, Titel Vereanu

...cu profesorul Bob Wissler
...cu profesorul Sam Silverstein

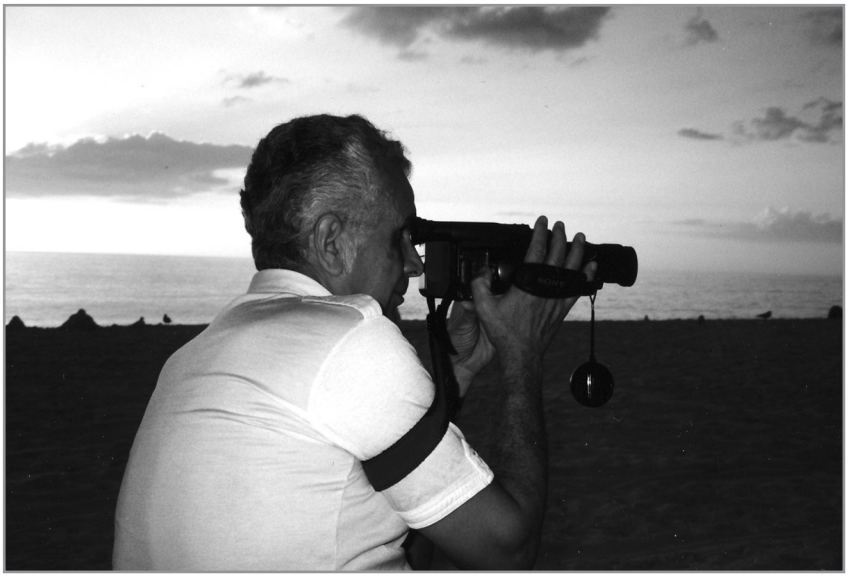


...cu profesorul Jim Jamierson
...cu profesorul Ramzi Cotran

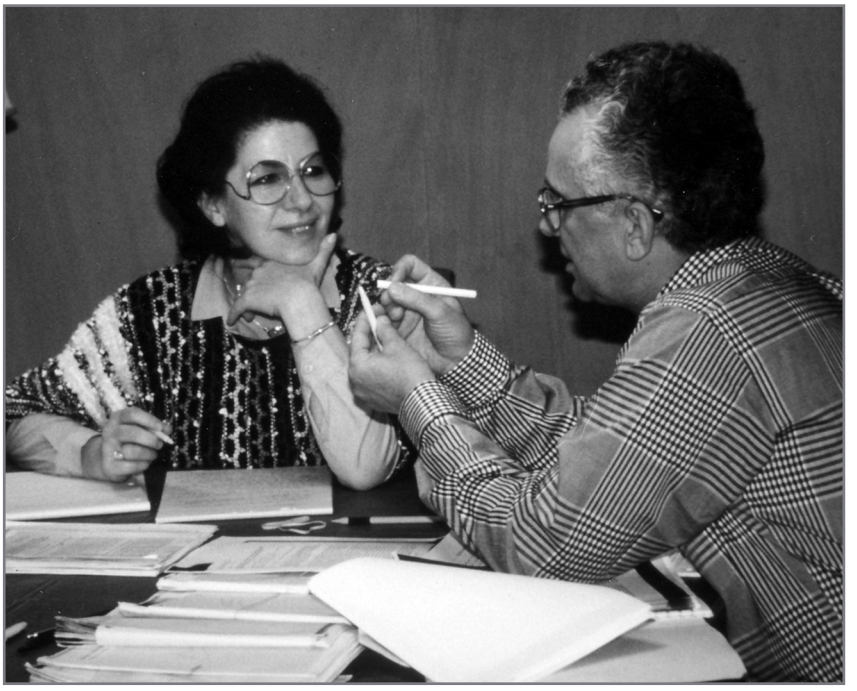
...cu profesorul Alan Fogelman
...cu profesorul Joe Witzum

...cu profesorul Nick Kefalides

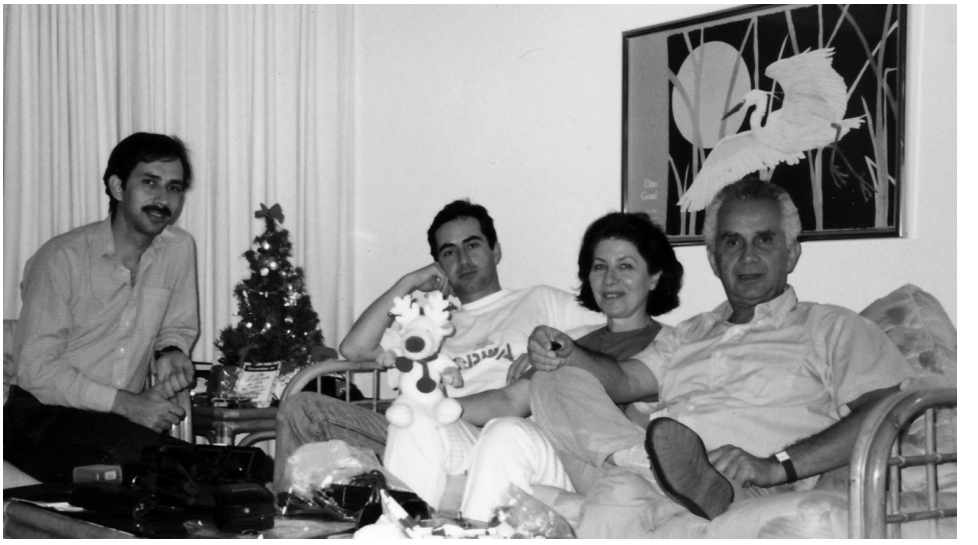
...cu noi



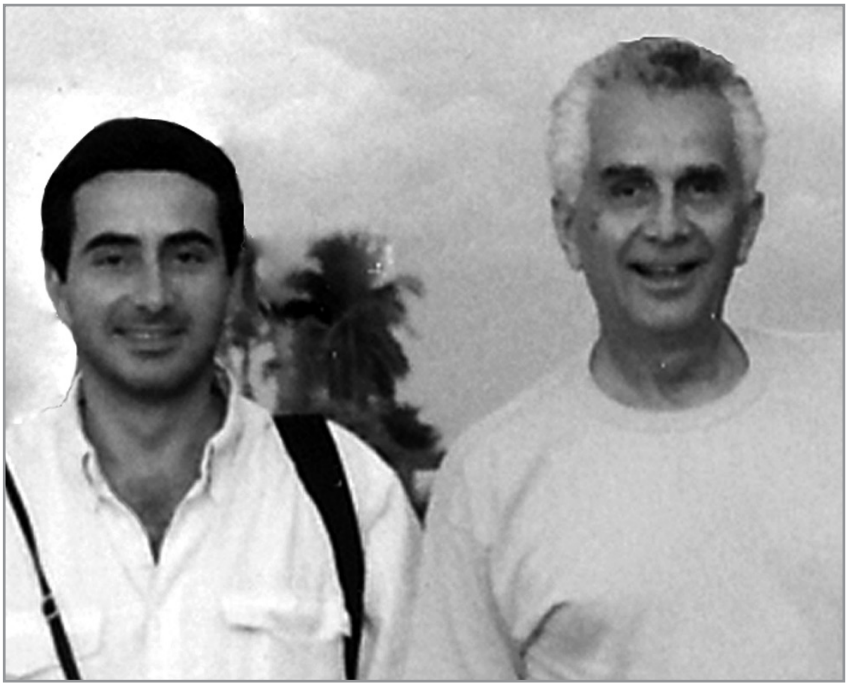
Albany 1978



...cu Vlad și Dan Simionescu la New York 1977



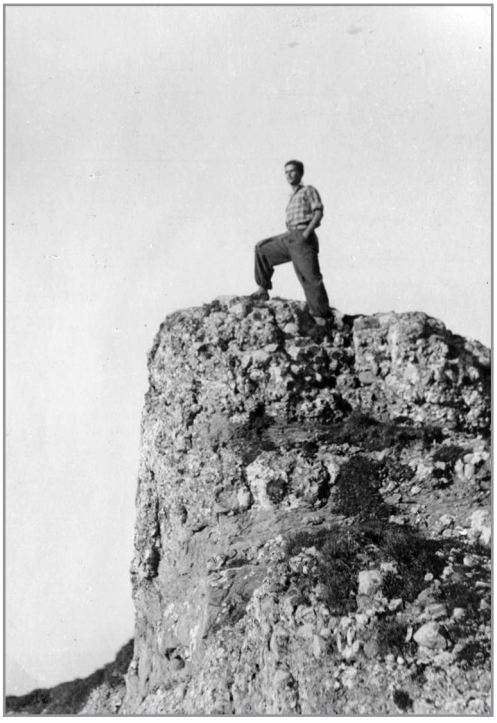
...Crăciun în familie



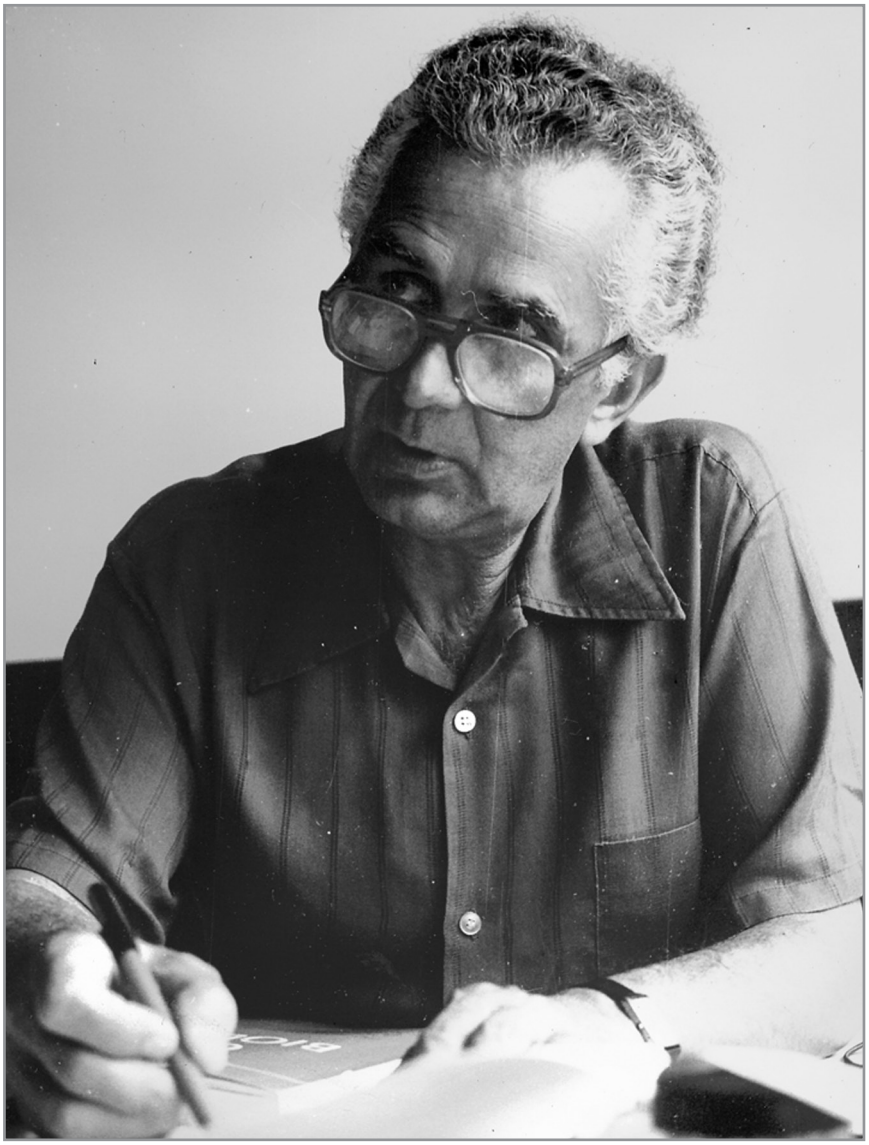
... cu Vlad
... cu Dan

...cu nepoata Adriana
...în familie 1992

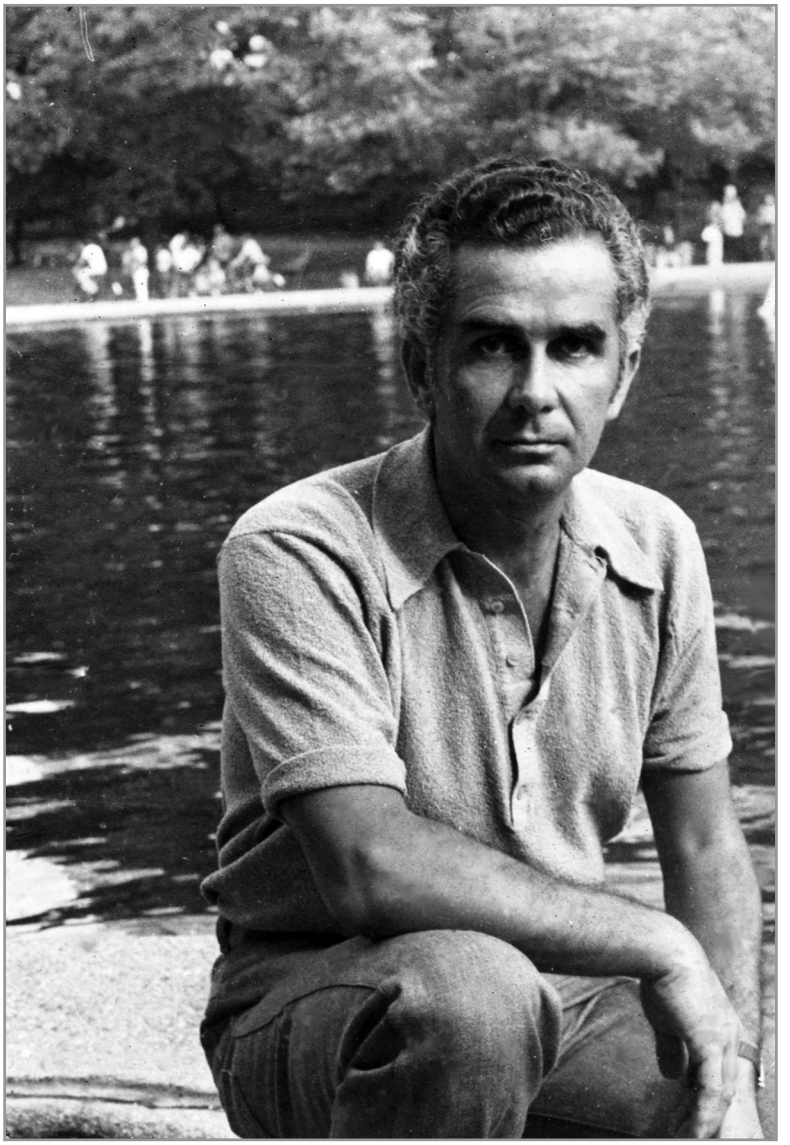
...cu băieții la școală
...la munte



Elevul Nicolae Simionescu 1940



București 1985



New York 1975

PRELEGERI ALE PROFESORULUI NICOLAE SIMIONESCU

MIHAI EMINESCU – UN SECOL DE NEMURIRE

ALOCUȚIUNE PREZENTATĂ CU OCAZIA COMEMORĂRII A 100 DE ANI DE LA DISPARIȚIA POETULUI IBPC, BUCURESTI, 25 IULIE 1989

Stimați Oaspeți, Stimați Colegi,

În primul rând, vreau să vă exprim întreaga gratitudine pentru prezența Dumneavoastră aici.

V-am invitat pentru ca împreună să creem și să împărțim momentele de încântare și meditație pe care le poate genera comemorarea unui unicat cultural de profunzimea și complexitatea "fenomenului Eminescu".

A comemora (a ne aminti împreună) pe Eminescu nu este numai un act de pietate și un câștig în înțelegerea valorilor culturale care definesc poporul român, ci și un prilej să reînvățăm a stima și a iubi valoarea. Când ne-am propus să-l comemorăm pe Mihai Eminescu, cineva m-a întrebat cu oarecare nedumerire, cam așa ***"Ce are Eminescu cu un institut de cercetare ?!"*** Dânsului nu am avut răgazul să-i explic, dar astăzi simt nevoia, și vă cer îngăduința să exprim unele gânduri despre ce rost are comemorarea lui Eminescu în Institutul nostru, gânduri care, de fapt, ating o problemă mai generală despre locul și rolul culturii în viața unui institut de cercetare. Un cunoscut profesor de biologie celulară și erudit istoric al cercetării experimentale, Frederick Grinnell definește astfel știința: ***"Știința reprezintă multe lucruri: este un mod de a gândi şi o activitate a unor indivizi în laborator, o instituție elaborat structurată care își recrutează și educă membrii, în esență este un segment sensibil, interactiv şi integrat al culturii şi societății moderne".***

De la conceperea lui, institutul nostru a fost gândit ca o instituție de cultură în care se lucrează știință. Această concepție avea la bază două idei general acceptate. Prima: știința este parte a culturii, iar a doua: cultura înseamnă deopotrivă trei lucruri: creație, asimilare și transmitere de valori. În fond, acest mod de a concepe un Institut, pune, la o scară foarte restrânsă, problema generală a rolului culturii în formarea unui om de știință.

Istoria Științei arată că un cercetător poate ajunge la o exprimare deplină a personalității lui creatoare, atunci când este sensibilizat prin cultură. Pe plan individual

este problema relației între creatorul de artă și receptorul (nu receptorul celular) om de știință. Orice receptor este un potențial creator, deoarece însăși asimilarea unei valori literare sau artistice poate conține componente ale unui act autonom de creație. Această fațetă a relației **cultură-știință**, dă un sens mai complex cunoscutului **Homo Cogitans - Homo Significans.**

Cu aceste idei în minte, iată-ne acum 10 ani, la începutul activității institutului, înconjurați de un grup de tineri - foarte tineri - deosebit de înzestrați și entuziaști. De la început, noi cei doi "seniori", am avut sentimentul responsabilității de a le asigura aici nu numai aparate, chimicale și cărți, ci și condiții pentru o formare complexă, în care să se îmbine armonios un înalt profesionalism cu o largă și nesaturată deschidere spre mesajele perene ale culturii. Această deschidere este însăși un element definitoriu al tinereții, pe care o formulează admirabil George Enescu în eseul intitulat ***"A fi tânăr": "Rămâi tânăr atâta vreme cât rămâi receptiv la tot ce este frumos, bun şi mare, la mesajele Naturii, Omului şi Infinitului".***

Și atunci, ca și acum, am fost profund convinși că, mai mult ca oricând, țara noastră are nevoie nu numai de buni tehnologi, ci și de creatori de știință sensibilizați și fertilizați prin cultură. Din astfel de oameni ies marii **patrioți.** În acei ani de început ai Institutului, fascinați și preocupați de aparate sofisticate și proiecte de cercetare, de rezultate noi sau eșecuri amărui, ne-a rămas relativ puțin timp pentru cultură. Totuși aproape zilnic, în orele de răgaz, se ascultă muzică clasică, se poate examina elaborata cartă a Istoriei Civilizației Universale (probabil unica în țară) în fața aforismelor lui Pasteur, Babeș, Einstein, alături de cele ale lui Brâncuși, Enescu sau Montaigne.

Ca biologi, am înțeles foarte bine că așa cum unele viețuitoare trăiesc în apă sau aer, omul trăiește în cultură, acel "ceva" dincolo de binele sau răul cotidian. Dar, tot ca biologi, ne-am dat seama că în lumea contemporană (deseori "o lume ca nelumea"), așa cum toate mediile naturale sunt poluate și cultura poate fi poluată. De aceea cred că este oportun să vorbim azi de o **ecologie a culturii** la care avem datoria de a participa activ pentru identificarea și combaterea surselor de poluare și a gravelor efecte pe care le pot avea asupra purității și viabilității moștenirii spirituale pe care o transmitem viitoarelor generații.

Acum, după un deceniu de activitate, Institutul și-a propus să treacă la o nouă etapă aceea a organizării și asimilării directe a unor acte de cultură. Prin asta nădăjduim să cultivăm în rândul titnretului nostru și cel de-al 3-lea parametru al culturii, anume responsabilitatea pentru transmiterea de valori, emanată din stima pentru valoare.

Pentru orice societate, inclusiv a noastră, progresul depinde de capacitatea de a forma "masa critică" de oameni demni, capabili și fermi să orânduiască natural scara valorilor, împotriva poluantei non-valori. O comunitate științifică care privește spre

viitor, inclusiv acest mic și modest institut, este vital interesată, nu atât în a redefini "lumea ca nelumea", și nici de a-i separa (așa cum spune Eminescu) pe "smintiți și pe mișei", ci în primul rând în a identifica, promova și ocroti acele realități care poartă în ele permanența spiritului și geniului creator al poporului nostru. Asta implică să urâm apatia și această comemorare este o luptă împotriva apatiei, pentru că - așa cum spunea un celebru gânditor: ***"Nepăsarea este treapta cea mai de jos a libertății".***

Iată ce rost are în Institutul nostru comemorarea lui Mihai Eminescu, acest "om deplin al culturii românești", cum îl numea Constantin Noica. Omul care, în numai 15 ani de creație, ne-a dăruit alături de o inegalabilă poezie, peste 14 000 de file de manuscris adunate în 44 de caiete. După opinia specialiștilor, acestea sunt comparabile poate doar cu caietele lui Leonardo da Vinci și Paul Valery, fiecare dintre ei beneficiind de aproape o jumătate de secol de creație. De ce sunt atât de importante pentru noi caietele lui Eminescu? Pentru că ele reflectă o imensă sete de cunoaștere pentru tot: filozofie, filologie, economie, istorie, etc. Și deși Eminescu nu și-a luat Doctoratul - caietele lui conțin zeci de pagini de adnotări de biologie, chimie, fizică, matematică. Comemorându-l pe Eminescu, reiterăm îndemnul, adresat îndeosebi tineretului nostru, pentru încredere în geniul creator al poporului român și năzuința activă spre o formare complexă.

Nevoia țării noastre de așa ceva este admirabil exprimată de Nicolae Iorga care definea astfel pe Eminescu și societatea din vremea lui: citez, și cu aceasta închei: ***"Un om complet, într-o vreme în care ceea ce este cel mai necesar pentru noi este această refacere a omului complet, pe care timpurile noastre l-au sfărâmat în fragmente, distrugând omenirea în însăşi esența ei inițială şi definitivă".***

"THE CELL, A WISDOM IN IDENTITY AND INTEGRATION" NICOLAE SIMIONESCU AND MAYA SIMIONESCU

ALOCUȚIUNE ȚINUTĂ LA SIMPOZIONUL INAUGURAL DE DESCHIDERE „BIBLIOTECA UNIVERSALIS", SZENTES – UNGARIA, APRILIE 1994

CONFERENȚIARII INVITAȚI:
Dr. Arpad Goncz, President of Hungary,
Mr. Ronald M. Blinken, Ambassador of USA in Budapest,
Dr. Lajos Koncz, Founder and director of Harvard Circle,
Dr. Jozsef Sz.-Rebeli, Mayor of Szentes,
Prof. Dr. K.D. Rainsford, Sheffield, England,
Dr. Maya Simionescu, ICBP, Romania,
Dr. Nicolae Simionescu, ICBP, Romania,
Dr. Sandor Szabo, President of Bibliotheca Universalis Foundation.

Mr. President,
Mr. Chairman,
Ladies and Gentleman,

Professor Maya Simionescu and I want to thank you for the privilege to participate in this outstanding symposium held with the occasion of the inauguration of this impressive achievement which is going to be Bibliotheca Universalis.
I am a cell biologist. As a perpetual student, I am humbly trying to understand a little bit about the marvelous organization of human body. During these attempts, I found that we know very little about human body cells. This is why, I am not going to tell you something on this topic. What I am going to speak about is something that I learned while watching the cells of living organisms, including humans, something very precious for my way of thinking as a citizen of this Continent.
I learned that during their billion years of evolution, by very simple means, the cells succeeded to accomplish what human population is striving to achieve: to survive, to propagate and to evolve.
It seems that, these fundamental units of life, the cells, facing the growing harassment of the environment, became wiser and wiser in finding ways to accommodate apparently opposite entities (encountered in any living community, including Europe) namely,

the harmony between unity and diversity
between identity and cooperation
between identity and integration.

With your permission, let me try to reveal some examples that might tell Homo Sapiens and Homo Europaeus, including Homo of this still unsettle part of Europe, that while the humans are seeking for intellectual mastery over Nature, they should listen and learn from the Nature's lessons. Allow me to give you some examples on which I build up this way of thinking.

The unity of life. The hierarchy of organization of the matter in nature, it's spanning on an unbroken line that begins in the world of elementary particles and ascends progressively through more elaborated structures which contains the previous level. At each level new properties emerge: the whole is more than the sum of its parts (Fig. 1).

THE HIERARCHY OF ORGANIZATION IN NATURE
- Emerging new properties at the sum of parts -

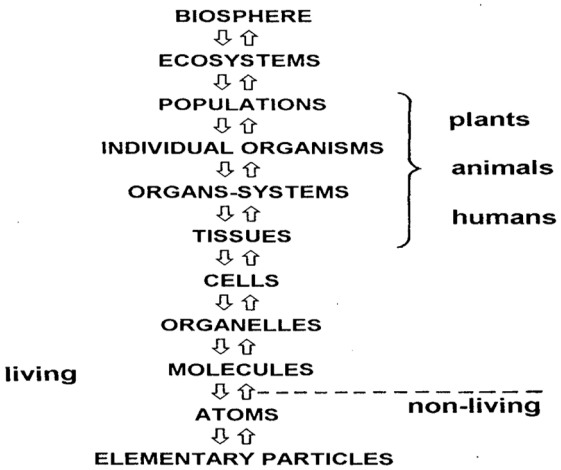


Fig. 1

The line starts with the elementary particles that form atoms, molecules, organelles, cells, the cells get organized in tissues, tissues in organs, organs in individual organisms that are organized in populations, which interact with the ecosystems that belong to the biosphere.

While the non-living matter stops at the level of the molecules, the living organisms contain all these common components and as the first lesson we should be reminded that we are build up on common components and we inherit the same heritage which is transmitted from one level to another of the organized matter. Starting with cells assembled in tissues, organs and organisms, and populations, we entered the realm of plants, animals and humans.

Because of the common components and of the universal heritage, there is a striking unity and simplicity in the molecular and cellular organization of the living matter.

The cellular basis of life. The cell is the fundamental unit of life, the smallest self-contained and self-reproducing structure. This cellular basis of life is believed to descend from an "archeotype" cell that, during the evolution and selection, was able to preserve its replication system. Upon interaction with the external medium, the cell continues to exchange matter and energy across a semi-permeable barrier: the cell membrane. This enables the cell to grow continuously from one generation to another by duplication and adaptation to the surrounding medium; that was the key of the continuity of living matter. That is why we define the cell as the fundamental unit of life, as being the smallest self-contained and self-reproducing unit (Fig. 2).

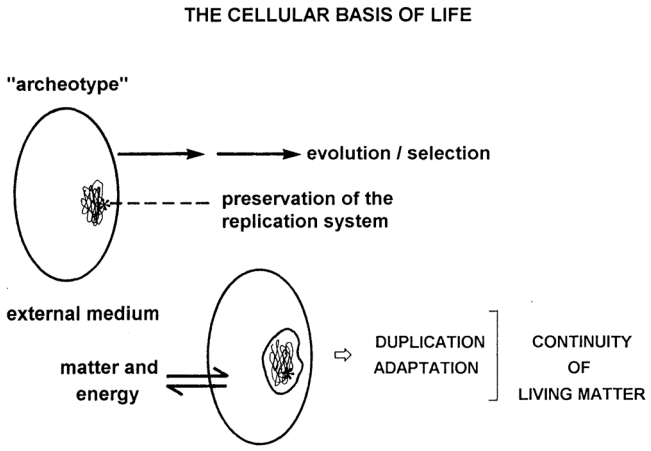


Fig. 2

When we look at the cell evolution and we take again the pathway from the common ancestor and the selection by evolution results that all eukaryotic cells, including the cells of the human body, have the same genetic material. But, what is very special is that this genetic material is only partially expressed in one cell or another, and this generates different cell type.

What we learn from this is that we all have the same genetic material, but under the influence of different intracellular or extracellular regulating factors, only some of this inherited material is expressed and this generates different type of cells. Just to give you an idea: when this genetic material, which is deoxyribonucleic acid, is expressing a certain gene, a special type of cell will be formed. When another gene is expressed, another type of cell will differentiate. Thus, quantitative and qualitative differences in the gene expression will generate cells specialized in transport, or in secretion or in contraction (Fig. 3).

I want to give you a figure which is just a coincidence. In the human body there are about 200 types of specialized cells. The number of the countries which belong directly

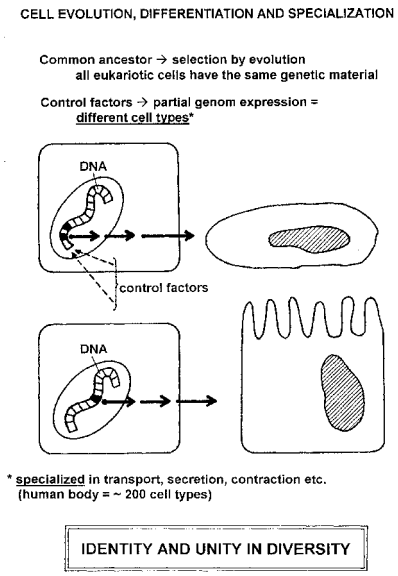


Fig. 3

or indirectly to the United Nations is again, about 200. It is just a coincidence…
What we can learn from these data is that, in the staggering diversity of cells, the identity and the unity of cells is maintained, and the cells manage to harmonize the identity, with unity and diversity.
Going further during the evolution, we learned that behind this diversity and complexity of the living organisms, there is a unity and simplicity in their molecular and cellular makeup, because all cells are buildup from the same material and all of them have inherited the same genetic material. Then, to be a cell one needs a memory tape which is the genetic information represented by the special molecule, DNA, and this molecule contains all the instructions for the replication of the cell and for the synthesis of cell components and products. To be a cell there is a need for a surrounding semi-permeable boundary which controls the exchanges and communication of the cell with other cell and the external medium, and there is a need for an energy generating system (Fig. 4).
We can look at the cell like being half way between the elementary particles (as shown in the first slide) and the biosphere. Also the cell can be considered as representing the whole universe reduced to its essence.
Specialized cells cooperate and build up tissues and organs. There are cells specialized in transport like for instance cells that line the intestine that have close cell to cell contacts securing the attachment of these cells between themselves; this is the epithelium. But in addition to that, in the intestine for the contraction, there are muscle cells (that form muscle tissue), connective tissue in which all these cells are embedded, extracellular matrix, and other types of cells like macrophages which are specialized in ingesting bacteria or things like that. They all form the organ. But in an organ, which it's made up by several tissues, each of them is maintaining its identity

as structure, its identity as function, but they cooperate, and what is crucial, because of this cooperation, the whole organ has richer capabilities that any of its parts (Fig. 5).

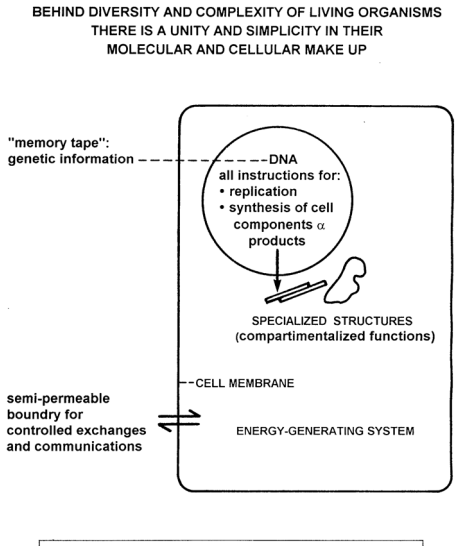


Fig. 4

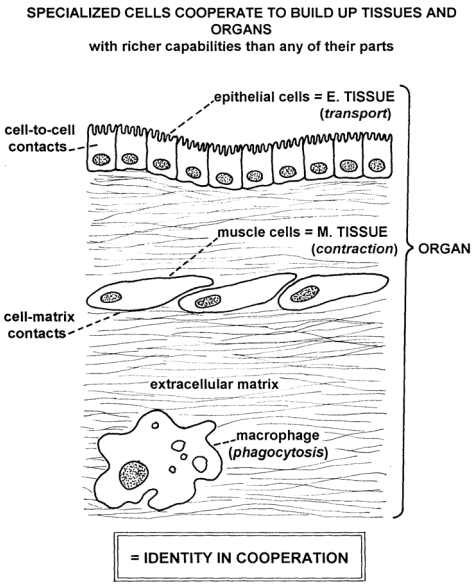


Fig. 5

Than if we want to be richer, and if we want to be more effective we have to cooperate, and while cooperating we should not be afraid about loosing identity.
There is a continuous two ways flow of matter and energy through the cell. Cells don't function isolated; through their plasma membrane some molecules (small molecules) are transported passively or actively, some other molecules are taken up and ingested, by endocytosis, some are transported across the cell by transcytosis, while some products of the cells are exported. Thus, cells and especially their plasma membrane are actively involved in import, transport and export; there is a continuous exchange of materials between the surrounding medium and the cells (Fig. 6).

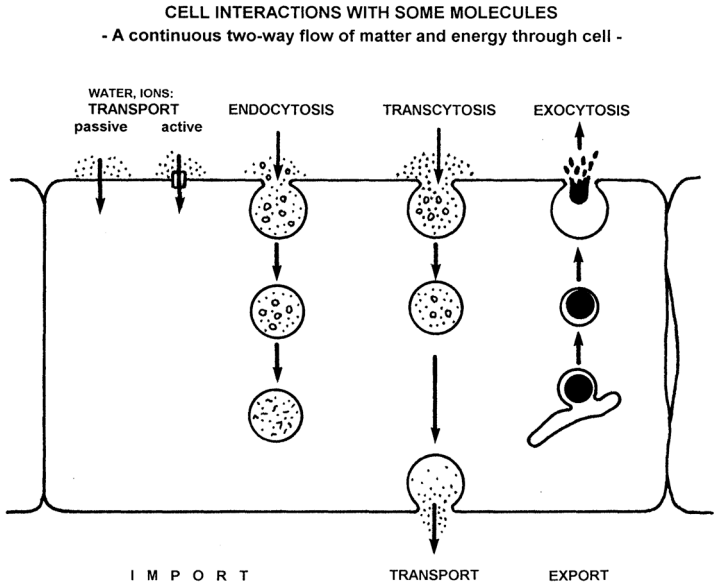
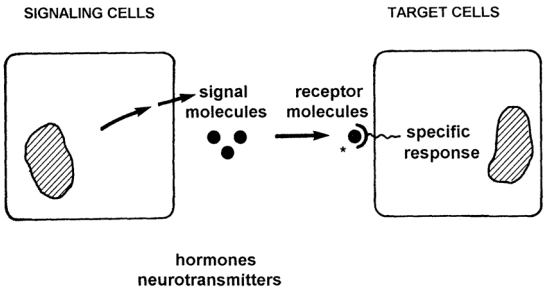


Fig. 6

Probably one of the most important ways to reach cooperation and integration is to establish communications. The general pattern of cellular integration by communication is a simple one. Usually one cell, which is the signaling cell, is secreting a signal molecule that is recognized by a receptor molecule of another cell, the target cell; this is the case of hormones and neurotransmitters (Fig. 7).
But, what is very important during this type of communication, is that the molecules never invade the cell privacy; the interaction takes place at the cell surface and triggers the interaction with host cells. Therefore, during communication there is plenty of room for keeping the cell's identity.

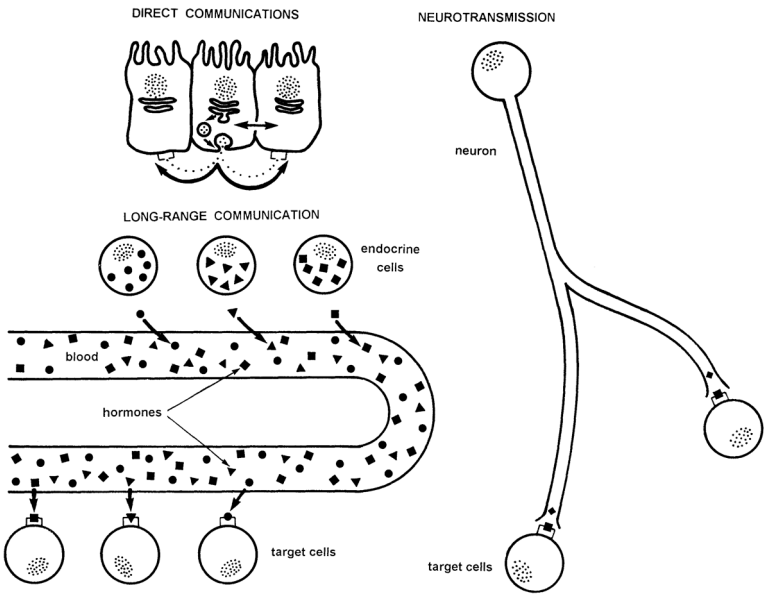
GENERAL PATTERN OF
TISSUES AND ORGANS INTEGRATION BY CELL COMMUNICATION



IDENTITY IN COMMUNICATION

Fig. 7

Fig. 8



Above (Fig. 8) there are some examples of cell communication: direct communication between cells or long range communication by hormones secreted by the endocrine cells in the blood, and from the blood they reach the target cells, or the transmission of the nervous impulse from the neurons to the target cells. On the whole there are long range and short range communication.
On a larger scale, cell and organs can be compared with modern cities and countries, in which there is a division of labor fulfilled by specialized compartments and services. By communication one achieves integration which is a prerequisite for building and maintaining an organism.
Sometimes organs and cells are assaulted by foreign invaders. To escape from an invader you need strong cells which can communicate and integrate to reach the same goals. Sometimes, the invaders last a little longer, sometimes the invasion is shorter. The overall idea is that to get off or prevent invaders, we should bear in mind that there are some others organisms that can help us, because we belong to the same environment, we belong to the common house we live in, which is made of the biotic communities and the ecosystems. Because actually, literarily speaking, ecology means the "study of the house".
Looking behind while thinking forward allow me to conclude by saying that the human being is a Society of cells, and that the human being is not only a maker and a builder, but also a learner (Fig.9).

INSTEAD OF CONCLUSION

a look behind thinking onward

Human being = a Society of Cells
a maker, a builder,
but also a learner:

Homo Europeus should learn from the wisdom
of its own cells
which, along millions of years, have proved
that they could not only survive but
also evolve, by harmonizing

IDENTITY WITH DIVERSITY
IDENTITY WITH COOPERATION
IDENTITY WITH INTEGRATION

Fig. 9

Homo Europeus, especially during this period when our continent is still not very well settled, should learn from the wisdom of its own cells, which along million of years have proved that they could not only survive but also evolve, by harmonizing: identity with diversity, identity with cooperation, and identity with integration.
Thank you for your attention.

PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU ÎN INTERVIU CU DOMNUL

NICOLAE TZONE

PROF. NICOLAE SIMIONESCU
ÎN INTERVIU CU DOMNUL NICOLAE TZONE
- APRILIE 1993 -

AMINTIRI DIN PERIOADA SUA ,
DESPRE GEORGE E. PALADE,
DESPRE CUM S-A NĂSCUT IDEEA INSTITUTULUI

Nicolae Tzone (NT) - D-le profesor, am ales pentru debutul dialogului nostru, cu speranta ca vă va face plăcere, un scurt fragment dintr-un amplu articol ce v-a fost dedicat, dv. și d-nei Maya Simionescu, foarte de curând, în revista Curierul Românesc. Autorul acestuia, dl. Ion Longin Popescu, își încheia pledoaria cu propozițiile care urmează și pe care am ținut neapărat să vi le reamintesc: "...dacă George Emil Palade nu ar fi primit Premiul Nobel pentru descoperirea granulelor care sintetizează proteinele, baza vieții, atunci marele savant, fără exagerare, ar fi trebuit să-l primească pentru descoperirea profesorilor Nicolae și Maya Simionescu ".

Nicolae Simionescu (NS) - Bine, dar aici este vorba de o metaforă ziaristică... Am, desigur, toată stima pentru dl. Longin Popescu, care e un foarte bun ziarist, dar cuvintele pe care abia le-ați reprodus reprezintă, evident, o exagerare.

NT - Cum l-ați cunoscut pe profesorul Palade ?

NS - Cred că aceasta se întâmpla prin 1968. Dacă îmi aduc bine aminte, profesorul Palade făcea parte dintr-o delegație a Academiei de Științe a SUA și se întorcea în țară, pentru prima oară, dupa foarte mulți ani. Da, erau 20 și ceva de ani de când plecase din România. În esență, profesorul a vizitat atunci mai multe institute de cercetare, a mers în câteva universități, a purtat, alături de membrii echipei cu care sosise, discuții cu persoane din conducerea Academiei Române. Între aceste vizite s-a situat și venirea sa la Institutul de Endocrinologie, unde lucram împreună cu Maya Simionescu. A stat cu noi în laborator aproximativ trei sferturi de oră, i-am arătat ceea ce lucram. Asa cum îl știm, profesorul Palade nu e un om care vorbește foarte multe, în special la primele lui reacții. Pot, deci, spune, ca întâlnirea de la acea dată n-a avut nimic extraordinar în desfășurarea sa. Noi i-am arătat ceea ce realizasem în studiul patologiei endocrine într-o prima fază de cercetare, în care introdusesem și metode de o performanță mai bună, cum era microscopia electronică ori citochimia, dar, repet, discuțiile, câte au fost, nu au depășit stadiul unei vizite protocolare.

NT - Putem fixa acum apariția ideii viitoarei colaborări cu dv.? Putem vorbi deja de prefigurarea realizării viitorului Institut de Biologie și Patologie Celulară în România ?

NS - Sunt convins și eu că profesorul Palade a înțeles, în mod sincer, să stabilească o legatură între laboratorul lui și laboratoare din România, dar încă nu putem vorbi, la aceasta dată, de ceva concret în acest sens. Nici nu se putea, de altfel, discuta serios despre o colaborare între un laborator care era în vârful piramidei științifice mondiale și oricare alt laborator din România, unde, practic, nu exista ceea ce constituia domeniul de predilecție al activității sale, biologia celulară. Nu poți face colaborare între unități disimilare din toate punctele de vedere.
Eu vă spun faptele, fără a le greva de romantism. Pe tot parcursul acelei prime întâlniri, a mea și a Mayei, cu profesorul Palade, n-a fost vorba nici măcar o singură secundă de o viitoare colaborare.

"A, VĂ DUCEȚI SĂ LUCRAȚI PENTRU ARMATA AMERICANĂ..."

NT - Ce s-a întâmplat mai departe ?

NS - Nu mică ne-a fost surpriza, anul următor, în 1969, când am primit invitația de a lucra cu dânsul la Universitatea Rockefeller, pe o perioadă de doi ani. Era, deci, vorba nu de o cooperare cu România, ci de dorința de a avea între oamenii din laboratorul său și doi români.
Numai că în paralel cu această invitație primisem și o alta, de la profesorul Gunter Barr, de la Institutul de Patologie al Spitalului Walter Read din Washington. În 1968 fusesem trimis de Uniunea Internațională contra Cancerului în trei mari centre care studiau cancerul tiroidian. Eu făceam parte dintr-un grup care examina anual la Bruxelles, la Institutul Jules Bordet, cazurile mai speciale de cancer tiroidian, ceea ce mi-a oferit prilejul câțiva ani de zile să interacționez cu experți în această problemă a cancerului tiroidian, din Europa. A fost o activitate extraordinar de interesantă și de instructivă pentru mine. În 1968 grupul european m-a trimis în SUA pentru a discuta cu experții de acolo, cu scopul de a ajunge la câteva puncte de vedere com¬une privind felul în care trebuiau diagnosticate cazurile grele, cazurile limită de cancer. Șederea, atunci, la Institutul de Patologie din Washington, a adus prin urmare, invitația pe care am amintit-o deja. Eram, practic, chemat să lucrez ca specialist în cancerul tiroidian câțiva ani de zile la Spitalul Walter Read, unde funcționa respectivul institut. Era vorba de un spital de elită, unde fuseseră operați președinții SUA, cu cadre medicale de primul rang.
Deci, în 1969, am avut aceste două invitații. Și nu ezit să vă mărturisesc că prima mea tendință, dincolo de ideea fascinantă de a putea fi alături de profesorul Palade, a fost să merg la Walter Read. Toată activitatea mea din ultimii ani fusese orientată spre patologie, aveam deja o oarecare poziție între specialiștii în domeniu și credeam că trebuie se continui în această direcție. Voiam să folosesc această cale pentru că timp de 20 de ani studiasem cancerul tiroidian la Institutul de Endocrinologie. Aveam în urmă o mulțime de lucrări, între care și o carte care chiar atunci, în 1969, a fost

tradusă în limba engleză și cerută pentru publicare de către editurile Haineman din Londra și Academic Press din SUA.

NT - Totuși, ați dat curs, până la urma invitației venite din partea profesorului Palade.

NS - Când am făcut cererea respectivă la Ministerul Sănătății, deoarece pe antetul invitației sosite de la Walter Read, care era un fel de echivalent al Spitalului Militar de la noi, figurau și cuvintele "US ARMY", au început întrebările. „A, vă duceti să lucrați pentru Armata americană...", mi s-a zis. În fine, nu mi s-a aprobat plecarea. Atunci am venit și cu invitația de la profesor, spunând ca aș putea se stau un an la Institutul de Patologie și un an la Rockefeller. "Negocierile", dacă le pot numi astfel, cu Ministerul Sănătății, au durat mai bine de o jumătate de an. Mi s-a dat voie, în cele din urmă să merg la profesorul Palade, acordându-mi-se viză numai pe o perioadă limitată de timp, prelungirea acesteia constituind, în fiecare an, o veritabilă bătălie cu autoritățile.

NT - Mai păstrați invitația pe care v-a trimis-o profesorul ?

NS - Da. Cred că da. În orice caz, obtinerea vizei a fost un pas foarte greu de făcut. A contat atunci enorm ajutorul dat de profesorul Burghele, care, pe de o parte, îl cunoștea și-l prețuia mult pe profesorul Palade, și, pe de altă parte, mă cunoștea și pe mine.

NT - Dl. George Emil Palade, de altminteri, în niste crâmpeie de amintiri, vorbește foarte frumos despre profesorul Burghele.

NS - Pe bună dreptate. A fost un om remarcabil. Știu că există păreri împărțite în privința sa. Știu că multi nu i-au putut ierta anumite particularități, dar, în totalitate, a fost unul dintre oamenii deosebiți pe care i-am întâlnit în deceniile trecute. Pot să vă spun că profesorul Burghele a avut un rol pozitiv, hotărâtor chiar, în câștigarea interesului autorităților române pentru înființarea Institutului de Biologie și Patologie Celulară.

"INSTITUTUL ROCKEFELLER ESTE UN LOC UNIC IN LUME, DIN TOATE PUNCTELE DE VEDERE"

NT - Ați plecat, așadar, la profesorul Palade, în 1970...

NS - Da, în 1970 am plecat în SUA. Mai întâi doar eu, pentru că nu au vrut să ne lase să plecăm împreună. Așa că abia peste câteva luni, după intervenții repetate ale profesorului, a putut să mă urmeze și Maya, care lucra în același domeniu. Ea a primit aprobarea pentru a sta în SUA numai un număr foarte mic de luni, urmând ca

la sfârșitul anului să revină în țară. Și, într-adevăr, la termenul respectiv, a sosit hârtie de la București ca Maya Simionescu să plece acasă. Abia acum îmi dau seama cât de cuminți și de inconștienți am fost amândoi. Adică, intelegeți, eram somați să ne întoarcem și noi am fi putut pur și simplu să ne vedem de destinul nostru științific, adică să ignorăm adresele sosite. Dar noi, nu, ca niste copii foarte cuminți, foarte ascultători, am spus "Gata. Ne despărțim din nou" și am pregătit bagajele Mayei pentru plecare. Era, într-adevăr, o demență să pleci din condițiile de acolo și să revii la București, pentru că așa a spus nu știu cine de la serviciul de cadre al ministerului. Abia în ultima clipă, iarăși datorită intervențiilor profesorului, Mayei i s-a permis să ramână să lucrăm mai departe împreună.

NT - Să zăbovim asupra sosirii efective în SUA...

NS - Am ajuns aici în februarie 1970 și am intrat în departamentul pe care-l conducea profesorul la Rockefeller. Așa cum se știe, Universitatea Rockefeller este un loc unic în lume din toate punctele de vedere și nu puteai să nu fii mindru, ca român, văzând cât de prețuit era George Emil Palade. În câteva luni, cum am afirmat deja, s-a adăugat și Maya echipei noastre, începând o colaborare care a fost deosebit de fructuoasă pe plan științific și foarte reconfortantă pe plan uman. Interrelația cu un om ca Palade a fost, din toate punctele de vedere, hotărâtoare pentru evoluția noastră ulterioară. Am lucrat la Rockefeller, în departamentul său, 4 ani, din 1970 până în 1973, inclusiv.

NT - "Echipa Palade" era mare ?

NS - Departamentul condus de profesor avea o echipă formată din mai multe grupuri, unele dintre ele având chiar o oarecare independență. În orice caz, el era incontestabilul șef al nucleului. Era, repet, foarte apreciat, foarte respectat. De altminteri, din grupul respectiv au făcut parte oameni care ulterior au fost inserați printre vârfurile mișcării internationale în biologia celulară, cum sunt : Sabatini, Blobel, Tashiro, Luck s.a. Au fost, personalități care ulterior au devenit ele însele staruri, valori de necontestat. De altfel, aceasta este una dintre particularitățile extrem de evidente ale influenței benefice pe care profesorul Palade a avut-o asupra colaboratorilor lui. Chiar neștiind foarte mult la început în domeniu, după doi sau trei ani maxi¬mum, petrecuți în departamentul lui, acumulările deveneau perspective enorme.
Nu aș putea să vă spun foarte exact din ce motive anume colaborarea noastra, a mea și a Mayei, cu el a durat neobișnuit de mult, mai mult decât cu oricare dintre ceilalți "elevi" și, deopotrivă, colaboratori ai săi. Ne-am acomodat foarte repede, ne-am simțit foarte bine aflându-ne în permanență în preajma sa, sentimentul care ne anima find reciproc. Când profesorul s-a mutat de la Rockefeller la Yale, am mers împreună cu el, rămânându-i alături încă 6 ani de zile.
Așadar, colaborarea noastră, extrem de strânsă, a durat, din variate motive, subiective și obiective, neobișnuit de mult. Zece ani în totalitate. Ne-am acomodat excelent în

permanență. Ne-am simțt foarte bine împreună și am certitudinea că sentimentele care ne-au unit au fost reciproce. Ne-au legat o cantitate și o adâncime de investigație și de lucru deosebit de puternice.
Deși ne-am reîntors în țară am rămas în cele mai bune relații de colaborare. Am revenit, practic, cu regularitate în SUA, atât eu, cât și Maya, ca Visiting Profesor la Yale. Păstrându-ne poziția aici, în ultimii trei ani am funcționat și la Universitatea Columbia, unde am primit o numire mai specială, de Distinguished Visiting Profesor.

"LUCRAM NU NUMAI ALĂTURI DE PALADE, CARE ERA MAGISTRAL ÎN TOT CEEA CE FĂCEA, DAR ȘI ALĂTURI DE ALȚI CERCETĂTORI, DEASEMENEA DEOSEBIȚI".

NT - D-le profesor Simionescu, să revenim și să insistăm asupra amintirilor pe care le aveți din perioada Rockfeller ...

NS - Da, perioada Rockfeller... A fost absolut unică. Locuiam în una din casele de oaspeți ale universității. Eram, în fine, atât de uimiți de ideea de a fi parte dintr-un anumit mediu intelectual și parte dintr-un anumit anturaj tehnologic încât, acum, când citim sau ne aducem aminte de epoca respectivă, aproape că ne pare un vis că vreme de doi ani de zile am ieșit numai patru duminici din laborator. Dar campusul Rockefeller era cu total special. Acolo aveai de toate: o sală de spectacole superbă, unde se dădeau săptămânal concerte; o bibliotecă imensă de circa două milioane de volume, care aproape că îți poruncea să te cufunzi în lecturi nesfârșite. Aveau loc în permanență conferințe pe cele mai variate teme, extraordinar de interesante. Partea alimentară nu era, de asemenea, o problemă: cofetărie, restaurant de bună calitate. Tot ceea ce înseamnă bunăstare, liniște, civilizație era cu prisosință asigurat. Și, bineînțeles, deasupra la toate, un laborator cum numai cu gândul, numai cu închipuirea îl puteai visa. Un laborator excepțional în care se lucra fără normă, fără nici un fel de constrângeri în sfera de cercetare. Lucram, apoi, nu numai alături de Palade, care era magistral în tot ceea ce făcea, dar și alături de niște oameni deosebiți, cu care și astăzi suntem strâns legați, numărându-se printre prietenii noștrii cei mai apropiați. Fiecare dintre ei a devenit fie șeful unui departament, fie șeful unei școli de biologie celulară în țara sa: în Italia, în Japonia etc. Toți ne-am nutrit de acolo. Toți am fost sprijiniți și îndrumați de profesorul Palade. Toți ne putem considera privilegiați, având șansa de a fi, în ultima instanță, un produs al școlii respective, dominată de personalități ca Palade. Totodată, alături de influența profesorului, am simțit foarte mult influența ambianței generale.
Exemplul pe care vi-l dau in acest sens este, cred, deosebit de concludent: în blocul de laboratoare în care lucram noi, la momentul acela erau cinci laureați ai Premiului Nobel. Da, într-un loc cât jumătate din institutul nostru de aici, din București, lucrau cinci laureați Nobel. Vă dați seama?

NT - Profesorul Palade avea, înțelegem, un anume fel de a fi, de a prețui, de a pune bazele unei colaborări și de a o continua...

NS - Desigur. Impunea prin prezența sa și, în genere, prin tot ceea ce făcea. Era un om exigent cu sine, în primul rând, dar era exigent și cu ceilalți. Și totuși, dincolo de această exigență, impusă, de altminteri, de o activitate științifică de amploare, simțeai, în permanență, că trăiești lângă un om care te respectă. Care-ți respectă punctul de vedere. Care ți-l acceptă dacă-l probezi. Era deschis totdeauna la interreacții. Pe măsură ce ne-am cunoscut mai bine, lucrurile s-au relaxat din toate punctele de vedere. Iar faptul că am reușit să producem, în anii aceia, să spunem, lucruri rezonabile, importante în plan științific, se datorează și imprejurării că ne-am regăsit trei personalități care ne-am completat foarte armonios - sigur, fiecare la dimensiunile și la nivelul său. Palade venea cu o mare experiență de lucru, cu o mare autoritate, iar noi aveam de partea noastră fantezia vârstei, dorința extraordinară de a participa la nașterea unor descoperiri științifice impresionante. Deci am introdus împreună o serie de metode, o serie de date și descoperiri care au rămas în literatura de specialitate.

NT - Cum a decurs activitatea la Yale?

NS - Aici, atât Palade, cât și soția sa, Marilyn Farquart, au capătat funcțiile de Full Professor. În ce mă privește pe mine și pe Maya, mutarea în această universitate a constituit prilejul - pe care nu l-am căutat, dar așa s-a întâmplat să fie - de a ne adăugă la activitatea științifică, care constituia singura noastră preocupare la Rockefeller, și pe aceea de învățământ. Spre deosebire de Rockefeller, unde departamentul în care lucram nu era implicat într-un proces elaborat de învățământ, la facultatea de medicină a Universității Yale a trebuit să se țină un curs de biologie celulară pe care l-a organizat și l-a condus exemplar, sprijinită in permanență de profesor, Marilyn Farquart. Ținând seama de experiența didactică pe care o aveam din țară - făcusem învățământ universitar la București, practic, 20 de ani - am devenit, dintr-o dată, unele din cadrele vechi, cu experiență, ca să zic așa, în învățământ. Și imediat am fost înglobați, și eu și Maya, în corpul didactic. Așa am ajuns să ținem, rămânând în continuare alături de profesor, cursuri de biologie celulară la Yale.
Aici structura cursurilor respective era în așa fel făcută, încât un curs ca acesta, de pildă, de biologie celulară, care se desfașoară trei luni în fiecare an, nu este susținut de un singur om, cum se obișnuieste la noi. Acolo cursul respectiv era, și este, predat de 15 - 17 oameni, de regula cei mai buni în disciplina respectivă, aduși de la diferite universități, unii dintre ei chiar dinafara SUA, cum suntem noi doi.
În ceea ce ne privește, dupa ce ne-am întors în București - ceea ce s-a întâmplat în 1979 - anual cei de la Yale ne-au reînnoit funcția de Visiting Profesor și ne-au chemat să ținem cursuri aproape 20 de ani, fără întrerupere, cursuri la această universitate americană, unde predăm și în prezent.

Reîntorcându-ne la profesorul Palade, trebuie să vă spun, în primul rând, ca şi la Yale, ca şi mai înainte la Rockefeller, s-a bucurat de o mare reputaţie, adăugând alte şi alte galoane prestigiului său. De altfel, în anul imediat următor mutării noastre la Yale, în 1974, i s-a atribuit, după cum ştiţi, Premiul Nobel.

"E O ÎNTREAGĂ POVESTE FERICITĂ ACEASTA, A NOBELULUL PRIMIT DE PALADE".

NT - Cum a primit vestea atribuirii Nobelului ?

NS - Eu nu am fost de faţă atunci. Vestea, previzibilă, de altfel, am recepţionat-o în avionul de New York, unde mă reîntorceam după o scurtă revenire în ţară. Profesorul mi-a mărturisit recent, la ultima sa vizită în România, din primăvara lui 1992, că păstrează încă biletul pe care i l-am scris eu în avion când am aflat ca i s-a acordat Premiul Nobel. El a primit înştiinţarea în Canada, la Halifax, în Noua Scoţie, unde fusese invitat să ţină un şir de conferinţe. În fine, e o întreagă poveste fericită aceasta, a Nobelului primit de Palade, pe care nu doresc s-o rezum.

NT - Totuşi...

NS - Sigur, a fost un entuziasm teribil în depar¬tamentul nostru. El s-a bucurat enorm. Merita deplin acest premiu. Dar, repet, n-a fost deloc o surpriză, nici pentru profesor şi nici pentru noi, colaboratorii şi apropiaţii săi, care ştiam că mai fusese de câteva ori propus în acest sens. Poate este important să amintesc că anterior primirii Premiului Nobel, în 1973, în perioada în care eu am venit în ţară cu planurile pentru viitorul institut din Bucureşti, am purtat discuţii cu conducerea de atunci a Academiei Române, spunând că Palade trebuie neapărat făcut membru de onoare, pentru că, mai devreme sau mai tarziu, va lua Premiul Nobel. Am incercat să-i conving cu argumente obiective, că este bizar ca un om de calibrul său să nu fie recunoscut de propria ţară. Am vorbit, îmi amintesc, cu Miron Niculescu, preşedintele Academiei, ca, de altfel, şi cu alţii de aici, dar totul a fost zadarnic. Nu s-a realizat propunerea pe care am sugerat-o Academiei Române. Am şi făcut, de altfel, mai multe adrese în direcţia aceasta. Palade nu ştia de demersurile noastre, ale mele şi ale Mayei, dar am considerat că era de datoria noastră să atragem atenţia în acest sens. "E timpul să vă purtaţi ca nişte oameni înţelepţi. Profesorul George Emil Palade ne onora ţara etc., etc." Cert este că n-a fost făcut membru de onoare al Academiei decât după ce i s-a atribuit Premiul Nobel. Cred că adresele noastre de atunci se mai află pe undeva prin arhivele de la Academie.

NT - Cum privea în perioada aceea profesorul Palade relaţiile sale cu România ? Ce discuţii aveaţi în această privinţă ?

NS - Mi-e greu să vă răspund concret la întrebarea aceasta. Palade este un om care e foarte mult axat pe fapte de viață, pe fapte științifice și nu pe fapte politice. Pe el l-a interesat foarte mult să meargă bine colaborarea cu noi și atâta vreme cât colaborarea aceasta a funcționat și apăream împreună prin tot felul de cărți: "the famous squad", "the famous trio", "the Romanian trio", ș.a.m.d., cred că a fost mulțumit. Era o confirmare că într-adevăr, alături de el, se formează niște oameni care, la rândul lor, pot să dezvolte biologie celulară în România. Prin urmare, pe Palade îl interesau - și aceasta constituie una din particularitățile sale esențiale - lucruri de substanță, nu lucruri politice, nu jonglerii din acestea temporare, exterioare preocupărilor sale. Palade, deși iubea și iubește România, nu a fost și nu este genul de om care să spună: "Nu mai pot de dragul țării" și alte bombasticisme asemănătoare. Acestea sunt jurnalisme, care, dupa câte știu, l-au și deranjat în câteva rânduri.
Știu foarte bine, fiind alături de el, că, de pildă, în primele interviuri care i s-au luat când a început să revină în România, i-au fost puse în seamă lucruri pe care nu le afirmase niciodată.

"ÎN S.U.A. NU AM PRIETENI DE CALITATEA LUI JUVARA, A LUI TITEL VEREANU, A LUI POMPILIU POPESCU, A LUI PANAIT SÂRBU"

NT - Să trecem discuția spre un teritoriu despre care, știu sigur, profesorul n-a făcut niciodată economie de cuvinte, atunci când i s-a oferit prilejul să vorbească. Am în vedere maeștrii săi: Rainer, Grigore T. Popa, Boivin.

NS - Într-adevăr, despre astfel de oameni Palade a avut întotdeauna o memorie foarte vie și caldă. A nutrit sentimente de respect față de Grigore Popa. Întâmplarea a făcut ca Grigore Popa să fie și primul meu mentor de aici, din țară, ceea ce a făcut ca discuțiile noastre cu privire la el să fie deosebit de frecvente. Pentru Rainer avea, de asemenea, o prețuire extraordinară. Fusese foarte apropiat de profesorul său mulți ani. Și aș vrea să vă semnalez, în aceeași ordine de idei, o alta temă, dacă pot spune astfel, a numeroaselor noastre conversații: oamenii de cultură din România anilor interbelici. Pentru câteva dintre marile personalități de atunci Palade avea o afecțiune deosebită. Îmi aduc aminte de calda lui apreciere pentru Vasile Pârvan. L-a cunoscut pe Enescu destul de bine și stiu de la el o serie de lucruri legate de marele nostru muzician.

Deseori discuțiile mergeau către prietenii studenției și ai tinereții petrecute la București. "În realitate - mi-a mărturisit nu o dată - eu, în S.U.A., nu am prieteni de calitatea lui Juvara, a lui Titel Vereanu, a lui Pompiliu Popescu, a lui Panait Sârbu". Toți aceștia sunt puși deoparte în inima sa. Ca și Radu Ghiulamila, la care ținea mult. Ei, bine, ori de câte ori ne aduceam aminte de ei, de acești vechi prieteni, erau momente de mare plăcere. Țin să subliniez acest lucru, mai ales că, la rândul meu - deși era o diferență relativ mare de vârsta la mijloc - devenisem, înainte de a

ajunge în America, bun prieten și cu Ion (Cuti) Juvara, și cu Titel Vereanu. Pe urmă, dupa sosirea în America, am interacționat în mod constant și sunt în foarte strânse relatii amicale și sufletești cu Radu Ghiulamila, cu Florica Parhon, oameni cu totul remarcabili. Norocul acesta, prin urmare, de a avea prieteni comuni, de a ne uni și o rețea de senti¬mente, de amintiri comune, a făcut ca legăturile între noi trei, între profesorul Palade, George sau Gigi, cum îi ziceam noi, Maya ș mine, să fie extrem de des¬tinse, să aibă o adâncime și relevanță dincolo de relațiile care se nasc de obicei între un maestru și colaboratorii săi. Legăturile noastre cu profesorul Palade au fost, mult mai mult decât obișnuitele, riguroasele relații profesionale cerute de munca de cercetare.

"TREBUIE SĂ FACI O CASĂ, TREBUIE SĂ AI O GRĂDINĂ ÎN CARE SĂ PUI UN POM"

NT - Cum s-a născut ideea Institutului de Biologie și Patologie Celulară de la București ?

NS - Nașterea acestuia a avut la bază un proces mai lung, pe care îl găsesc absolut firesc și în preajma căruia am putea glosa îndeajuns. Vedeti dv., că vrei să te intorci sau nu vrei să te intorci în țara ta de origine, că vrei săa faci ceva acolo sau nu vrei, eu am considerat și consider că este ceva foarte personal. Nu găsesc că am facut ceva nemaipomenit prin faptul că ne-am întors în România. N-am făcut niciodată caz toți anii trecuți în privința aceasta, deși, cum puteți bănui, facilitățile pe care le-am avut în America le depășeau de nu știu câte ori pe cele ce urma să le primim în România. Dar, încă de la bun început ideea noastră de bază a fost pur și simplu să ne formăm acolo și, cu ce învațăm acolo, să ne întoarcem în țară și să facem o casă. Sentimentul acesta al instituției a fost foarte puternic la noi și e foarte puternic și acuma. Credem, și eu și Maya, în puterea instituțiilor. Trebuie să faci o casă, trebuie să ai o grădină în care să pui un pom. Trebuie să ai o casă în care să pui un robinet, pe care s-o înzestrezi cu tot ce este necesar pentru a putea, în felul acesta, să creăti niște oameni în jurul tău. Niște oameni deosebiți. Să faci, ceea ce se spune în termeni mai pedanți, o școală. O școală pe care s-o ridici la rangul de instituție. Și cum în anii în care noi am început activitatea în America, virtual biologia celulară nu exista în România, gândul de a fi întemeietorii acesteia aici l-am avut în permanență.
Erau, desigur, o serie întreagă de încercări merituoase ale unor oameni, dar virtual biologia celulară nu exista la noi. Când, dupa primul an la Rockefeller ne-am pus problema "ce facem ?", profesorul Palade ne-a spus: "Mai stați un an de zile. Unde să vă întoarceți acolo?" El era foarte realist. "N-aveți unde să lucrați. Nu vă mai puteți întoarce. Avea dreptate, pentru că la București ședeam propriu-zis într-un laborator în care exista un singur microscop cu lumină. Deși lucram și dormeam în laborator săptămâni după săptămâni, totuși absența aparaturii era esențială. De fapt, Palade ne-a

și explicat, la un moment dat, de ce ne-a invitat pe noi, la prima sa vizită în țară, dintre toți cei cu care a interacționat: "Mi-ați facut impresia că sunteți niste sisifi amândoi și mi s-a părut că-i păcat de voi să nu vi se creeze niște condiții de lucru rezonabile". Dar să revin la întrebarea pe care mi-ați pus-o: "Cum s-a născut ideea institutului?". Un prim sentiment a fost următorul - noi trebuie să ne întoarcem. Vom învăța o meserie, având privilegiul să fim lângă un om ca Palade și beneficiind de niște conditii excepționale, oferite de Institutul Rockfeller, dar e de datoria noastră să revenim. Pe de o parte pentru a ne asigura un loc unde să putem sâ continuăm ceea ce am învățat acolo, iar pe de altă parte, dincolo de interesele noastre imediate, să putem să ajutăm, la rândul nostru, tinerii care vor să urmeze această cale, a cercetării în sfera biologiei celulare. Probabil că era la mijloc și un anumit sentiment care ținea de biografia personală, legat, în special, de frustrațiile pe care le-am îndurat în tinerețe. Pentru că am fost un chinuit în tinerețile mele, din punct de vedere a ceea ce am vrut să fac și a modului dureros în care am fost marginalizat în permanență. Nu vreau să mă lamentez și nu vreau să discut despre greutățile, inechitățile crase de atunci, dar nu pot să uit că mi s-au mâncat ani foarte prețioși din viață: nu mi se dădea voie să ies nici măcar până la Sofia, la un congres științific. Cu toate că publicasem deja destul de mult în străinătate. Și tot așa: nu și nu, și nu, și nu. Poate cu un alt prilej, o să vă povestesc o serie din nedreptățile din acea perioadă.

Ideea de reținut este, în esență, aceasta: voința mea și a Mayei, ca atunci când vom putea să-i ajutăm pe tineri să nu mai sufere ce-am suferit noi, să nu ezităm. Simplu de spus așa ceva, dar, cum bine știți, foarte greu de realizat. Eram, prin urmare, conștienți că întorcându-ne în România o să avem mari bătăi de cap. Dar am făcut-o, fără nici o ezitare. N-am avut, nici un fel de gânduri vreodată să facem altceva decât să ne întoarcem aici. Și, la un moment dat, în 1972, într-o suită de împrejurări care sunt foarte amuzante, dar nu e timp să discutăm despre ele, m-am așezat, împreună cu Maya, în fața unei hârtii de împachetat și am spus și unul și altul în același timp: "Hai să facem un centru modern de biologie celulară, să adunăm niște tineri în jurul nostru, să-i formăm ca un fel de familie și să asigurăm, astfel, o oază de muncă și de liniste, și de seriozitate". Planurile inițale, devenite spre sfârșit din ce în ce mai consistente, le-am arătat și profesorului Palade. El, sincer vorbind, s-a arătat destul de sceptic că vom reusi să facem așa ceva. L-am înțeles foarte bine, pentru că a încerca să aplicam planul nostru, însemna, practic, a intra într-o aventură al cărei sfârșit era greu de prevăzut din punctul lui de vedere.

NT - Deci profesorul s-a arătat mai degrabă neîncrezător...

NS - Scepticismul lui era îndreptățit. Entuziamul nostru, desigur, își avea justificarea sa, dar el, mai realist decât noi, anticipa că vor fi foarte mari greutăți și că va dura foarte mult până la materializarea unui asemenea proiect. Riscurile, apoi, pe care le presupunea o asemenea inițiativă, erau extrem de mari. În fine, în acelasi an, 1972, am transmis o propunere la autoritățile române. Dacă îmi aduc bine aminte, am

transmis-o prin profesorul Burghele, care era la Ministerul Sănătății. În 1973 - aproape că nu ne venea să credem - am primit răspunsul că propunerea noastră pentru înființarea unui centru de biologie celulară este aprobată, dar cu condiția ca noi să ne ocupam de el. Să asigurăm planurile arhitecturale de dotare, pentru că modele, în privința aceasta, în țară nu existau. Vedeți, daca voiai în România, la momentul acela, să faci, să zicem, o clinică de chirurgie, aveai excelente exemple, existând numeroase clinici conduse de chirurgi de prima mână. Nu era nevoie să te inspiri din altă parte, nici din punct de vedere organizatoric, și nici profesional. Dar ca să realizezi un institut de biologie celulară pornind de la zero, nu era deloc ușor. Și atunci, din tot ce am văzut la Rockefeller și în alte țări din Occident – și, desigur, am avut prilejul în anii respectivi să vedem foarte mult - am căutat să selectăm cele mai viabile soluții.
Am făcut, Maya și cu mine - și acele schite inițiale ne-au fost de mare folos - un plan pe care l-am trimis la București. Încă o dată vă spun: profesorul Palade era destul de sceptic în privința reușitei. Planul a fost aprobat de principiu, cerându-ni-se să venim să purtăm discuții la București. Aici am stat de vorbă cu o serie de oameni, în special cu profesorul Burghele și cu Paul Niculescu Mizil, care era ministrul Învățământului. Burghele a fost cucerit de idee și acest lucru a fost deosebit de important, deoarece el avea influență, avea trecere la autorități.
Așadar, pe scurt: din '73 și până în '79 am revenit în țară în fiecare an. Practic, am petrecut vacanțele noastre lucrând cu constructorii, cu ar-hitecții, cu instalatorii. În '77 a fost și cutremurul deosebit de violent, care a întârziat și el lucrările. Câteodată am stat în țară o lună, altădată două luni, altădată trei luni de zile. Profesorul a fost, însă, alături de noi. A fost foarte înțelegător, deși americanii spuneau că suntem niște "patrioți superstițioși" și nu înțelegeau de ce ne trebuiau nouă asemenea complicații. Aceasta, mai ales că atmosfera de destindere de prin anii '68, când România a refuzat să intre în Cehoslovacia, devenise, în anii '75 -78, o amintire.
Au fost și alte semnale care pentru niște oameni nu prea bine orientați politic, cum eram noi, erau departe de a fi anunțătoare de o oarecare îmbunătățire a situației. Așa că atunci când noi ne-am întors în România, situația generală a țării era deja profund alterată. Îmi amintesc vorbele din acea vreme ale profesorului Palade: "Mai gândiți-vă încă o dată înainte de a face acest pas". Deci el, încă o dată, și-a exprimat rezerva că totul va merge foarte bine. Aceasta chiar în ciuda faptului că, de pildă, la venirea sa în București, în 1975, după ce a primit Premiul Nobel - atunci a fost făcut membru de onoare al Academiei Române -, a pledat răspicat pentru realizarea institutului nostru pe lângă autorități. "E bine să faceți așa ceva" a susținut în întâlnirile oficiale. Mai mult chiar, a adăugat : "Acest exemplu trebuie repetat și in alte domenii". Când, anul trecut (n.r. - 1992), a venit la Conferința Rectorilor de la Sinaia, a exprimat aceeași poziție: "Modelul Simionescu trebuie repetat și în alte domenii..."

"IBPC ERA, IN MINTEA DICTATORILOR, O AGENTURĂ DE SPIONAJ A CIA"

NT - Din câte ştim, profesorul Palade a vorbit, nu o dată, cu diferite prilejuri, despre "Experimentul Simionescu".

NS - Da, "Experimentul Simionescu". Palade a rămas constant pe ideea aceasta. Este cert că fără contribuţia sa la sensibilizarea autorităţilor române, fără prestigiul său, lucrurile ar fi fost mult îngreunate. Din nefericire, paranoia instalată la conducere, în special după 1980, a făcut ca Palade să nu mai fie primit în ţară cu consideraţia dinainte, să nu mai fie consultat. Acum, când mergea în ţară, el venea la noi la institut, ţinea aici o conferinţă, mai interacţiona cu nişte oameni. Doar atât. Nu-l invita nimeni la Universitate, nu-l invita nimeni la Facultatea de Medicină. Când îi văd azi pe toti "eroii" aceştia care fac atâta show în jurul lui, nu pot să-mi opresc zâmbetul. Mă intreb de ce niciodată Facultatea de Medicină din Bucureşti nu l-a chemat pe marele Palade să ţină cursuri la studenţi. Acum, cand s-au schimbat lucrurile, toţi au devenit curajoşi. Toti îl revendică pe Palade. Spun asemenea lucruri cu toată responsibilitatea. Cu toată tristeţea.
Deci Palade a avut drumul totdeauna spre acest institut, în care, atât cât a putut sâ se reîntoarcă în ţară, la doi ani sau şi mai rar, venea şi stătea câteva zile. Aveam, de fiecare dată discuţii foarte interesante cu el. Aceasta este realitatea. În afara de institut, unde era întotdeauna primit ca un mentor, celelalte instituţii, practic, îl ignorau. Iar dintre cei care reprezentau autorităţile, nu mai îndrăznea să-l primească nimeni. Vă aduceţi aminte, nu, că Madam Cutare de pe vremea aceea, considera că prestigiul unui laureat al Premiului Nobel este o nimica toată faţăa de "prestigiul" ei mondial. Şi starea aceasta de lucruri a mers mână în mână şi cu înrăutăţirea situaţiei noastre, a mea şi a Mayei, care am fost supuşi unor tot mai aspre îngrădiri. Dar intrăm deja într-o altă poveste, intrăm în domeniul lamentărilor şi nu vreau să insistăm.
Ne-a fost, aşadar, din ce în ce mai greu să plecăm din ţară, depăşindu-se, în 1989, acuzaţiile de tip formal. Astfel, acum am fost chemaţi la minister, unde ni s-a spus: "Şeful Securităţii, tovarăşul Postelnicu, vă acuză că sunteţi spioni americani, care vindeţi Statelor Unite secretele ştiinţifice ale României". Ni s-au cerut o serie de documente prin care să arătăm că nu am vândut secrete. În fine, a fost o perioadă foarte tristă...

NT - Întrebat, la un moment dat, dacă a fost urmărit de Securitate (Curierul Românesc, iunie, 1992), profesorul Palade a dat următorul răspuns: "Am fost, probabil, urmărit de câte ori am venit să-mi vad surorile, să-i întâlnesc pe profesorii Nicolae şi Maya Simionescu, să particip la diferite simpozioane. Câtă vreme regimul nu-şi putea exercita în întregime influenţa asupra Institutului de Biologie şi Patologie Celulară, (institut care beneficia şi de o importantă finanţare americană), era firesc să fiu urmărit, deoarece eu aici veneam la întâlniri de lucru cu cercetăatorii români. Or,

IBPC era, în min¬tea dictatorilor, o agentură de spionaj a C.I.A."

NS - Da, așa au stat lucrurile. Presiunile exercitate asupra noastră au fost din ce în ce mai consistente, mai dese. Organizat cu suport din partea S.U.A., în septembrie 1989 am avut un workshop româno - american. Am fost chemați la minister și trași la răspundere: "Trebuie să vă apărați, ni s-a spus, că aveți trei capete de acuzație. Primul că sunteți spioni, pentru că ați vândut secrete științifice românesti americanilor. Al doilea, tot ce ați lucrat, toate temele pe care le-ați avut n-au fost niciodată aprobate de statul român..." Se susținea, deci, că am lucrat în particular, sau cam așa ceva, că am făcut doar ce am vrut noi. Și dacă prima acuzație era o aberație, în chestiunea că noi am făcut în institut doar ceva ce am socotit că trebuie săa facem, era chiar adevărul. Nu eram, să zicem, prea bine acoperiți din punctul acesta de vedere, deși ne-am îngrijit să fim, an de an, prinși, totuși, în planurile de cercetare ale ministerului.

NT - Și a treia acuzație ?

NS - Era de-a dreptul pueril și relativ ușor de contracarat. În esență, eram învinuiți că nu publicam decât în America și ca n-am publicat nimic în România. Or realitatea era că publicasem foarte mult și în România. La argumentele aduse de noi, ni s-a precizat că trebuia să publicăm mai întâi în România și abia apoi în străinătate. Ca și cum cineva poate să publice o lucrare științifică de două ori...

"CLIPELE DE SĂRBĂTOARE ADEVARATĂ N-AU ȚINUT PREA MULT"

NT - Să insistăm asupra momentului inaugurării activității institutului, moment care, dincolo de greutățile în fond inerente, a constituit un moment de răscruce în viața dv.

NS - Am avut atunci, în 1979, un simpozion in¬augural, la care a fost prezentă o serie întreagă de somități, între care capetele de afiș le-au constituit Palade și de Duve, cu care profesorul a împărțit, în 1974, Premiul Nobel. Clipele de sărbătoare adevărată n-au ținut însă prea mult. Pentru că ministerul ne-a adus la cunoștință că nu poate să ne asigura nici un fel de fonduri. Înțelegeți, dupa ce am făcut tot ceea ce am făcut pentru înființarea institutului, după ce am revenit în țară, ni s-a spus: "Regretăm, dar din momentul acesta sunteți fără nici un ban". Și atunci soluția a fost una singură: să apelăm la niste subvenții din afară. Am intrat, astfel, în sistemul de competiție pe care-l folosesc Institutele Naționale de Sănătate din S.U.A. (The U.S. National Institutes of Health, prescurtat NIH). Și, spre șansa noastră, înregistrând scoruri suficient de bune, am primit timp de nouă ani subvențiile solicitate. Am fost singurul institut din Est care a beneficiat de sprijin.
Pe deasupra, americanii care ne cunoșteau foarte bine din ceea ce am publicat, și eu și Maya fiind profesori ai Universității Yale, ne-au trimis anual, o bună bucată de timp, studenți pentru a-și face lucrările de diplomă la noi la institut. Ei veneau pe perioada

de vară, trei luni de zile, și făceau aceste lucrări în special sub conducerea Mayei Simionescu. Am avut în institut 7 studenți subventionați de Universitatea Yale.
Semnificativ este că în aceeași perioadă nici unui student de la Facultatea de Medicină nu i s-a permis să-și facă lucrarea de diplomă la noi. Justificându-se totul în fel și chip. E o chestiune, nu-i așa ?
Pe lângă fondurile pe care le-am primit prin grant-urile amintite, puse la dispoziție de Institutele Naționale de Sănătate (NIH), fonduri care s-au ridicat în total la peste 400.000 dolari, din 1979 și până în anul acesta noi ne-am făcut un obicei - nu foarte confortabil, nu foarte simplu - din a aduna materiale pentru institut. În acest mod, colectam de la prietenii noștrii, de la colegi, de la cunoscuți, chimicale, cărți, reviste, chiar unele piese de echipament, chiar unele aparate mai costisitoare. Le împachetam, le încărcam într-un camion pe care-l inchiriam și-l conduceam de la New Haven la aeroportul Kennedy din New York (cca 120 km). Aveam o combinație cu TAROM-ul din București, care ne permitea să plătim transportul în lei. În medie transportam cam o tonă de materiale și echipament în fiecare an. Cu totul am transportat până acum peste 14 tone. N-am făcut niciodată caz de lucrurile acestea, dar cred că trei pătrimi din ceea ce există în institut sunt lucruri aduse de noi. Dacă puneți la socoteală și faptul că n-am primit aproape deloc sprijin valutar de la statul român, se poate spune, pe bună drep¬tate, că, într-un fel, cum ni s-a și reprosat, ca institutul e făcut „la particular". însumate, valorile lucrurilor aduse de noi s-au ridicat la cca 800.000 de dolari. Cum investiția pentru institut, cu aparatură cu tot, a fost de peste 700.000 de dolari, aș putea zice că am amortizat investiția respectivă prin ceea ce am adus în țară. Să vă mai spun că o doamnă ministru a învățământului ne-a trimis în institut o comisie de anchetă să vadă ce fel de publicații suspecte am strecurat in tara, aflând că ne-au venit de la aeroport un transport din coletele pregătite de noi în S.U.A.
Fără aceste materiale aduse, institutul nu ar fi putut funcționa. Vă spun sincer că nu era deloc amuzant să împachetezi între 50 și 100 sau mai bine de 100 de colete, să le încarci (numai Maya și cu mine), pe urmă să șofezi camionul, care avea două tone, să-l duci pe drumul ăla, pe drumul ălălalt, apoi să descarci aceleași colete la aeroport. La Otopeni, câte un coleg de-al nostru, venit să ne ajute la descărcat, se plângea, mai în gluma, mai în serios: "Domn' profesor, nu mai faceți așa grele coletele! Făceți-le mai ușoare..."

NT - Cum privea profesorul Palade toate aceste "aventuri" ?

NS - Înțelegea deplin ce efort făceam. Înțelegea sacrificiul nostru și, atât cât i-a stat în putință, deși inițial ne avertizase ce ne așteptа, ne-a ajutat, ne-a susținut moralmente. Bineînțeles că s-au găsit unii și altii din țară care să spună: "Păi de ce Palade nu susține bănește institutul? De ce nu dă bani?" Or Palade era un cercetător, un salariat în definitiv. Ca să nu mai vorbesc de enormitățile proferate de propaganda comunistă, ca Palade și-a dat Premiul Nobel României și pe baza banilor respectivi s-a făcut institutul acesta. Și tot așa, alte și alte invenții. Omul Palade, cu cele mai bune intenții

pe care le-ar fi avut, nu putea să dea institutului decât prestigiul lui. Şi, cu adevărat, în permanenţă prestigiul său imens s-a răsfrânt benefic asupra acestei instituţii.

"NICOLAE, ŞTII CARE ESTE IMPRESIA MEA DESPRE INSTITUTUL VOSTRU ? CĂ SUNTEŢI AL 52-LEA STAT AL SUA"

NT - Vă rog să comentaţi următoarea afirmaţie a profesorului Palade, flatantă într-adevăr, făcută la adresa dv. şi a doamnei Maya: "Americanii au fost plăcut surprinşi să constate ca în realitate ei au învăţat mai mult de la cercetătorii români decât cercetătorii români de la ei. Asta nu se întâmplă deseori în lume Se întamplă rareori. Totul se datorează felului în care a fost organizat acest institut de către profesorii Nicolae şi Maya Simionescu, biologi celulari de notorietate internaţională, care au lucrat în laboratorul meu din SUA, fiecare câte zece ani".

NS - Mai mult decât a spus profesorul, ce-aş mai putea spune? Este, cu siguranţă, o apreciere deosebit de amabilă la adresa noastră, o apreciere deosebit de generoasă. Realitatea e – şi profesorul Palade, care a format în laboratorul său cercetători de elită, ştie mai bine decât oricine lucrul acesta – că institutul din Bucureşti, prin rezultatele cercetărilor sale, materializate în atatea cărţi, comunicări, articole care au intrat în circuitul ştiinţific major, este undeva pe hartă şi meritul e nu numai al nostru, al meu şi al Mayei, ci al întregului colectiv de aici, al tuturor oamenilor care au lucrat alături de noi atâţia ani. În mod deosebit, aş vrea să menţionez pe unii dintre cei cu stagii mai vechi şi realizări ştiinţifice deosebite: Doina Popov şi Ina Heltianu (recent primite ca membrii corespondenţi ai Academiei de Ştiinţe Medicale), Anca Sima, Felicia Antohe, Nona Constantinescu, Ileana Mânduţeanu, Cristina Lupu, Dorin Alexandru, Monica Raicu, Florin Lupu ş.a, iar dintre cei mai tineri Ludy Dobrilă, Anca Dobrian şi alţii în curs de formare. Pentru contribuţii importante şi organizatorice, i-aş menţiona pe C. Neacşu, Maria Calb, V. Jinga, A. Hillebrand. Proiectele de cercetare beneficiază şi de un excelent grup de tehnicieni şi laboranţi. Este foarte important că emblema institutului este pe toate aceste tratate pe care le vedeţi aşezate în rafturile pline din biroul meu.

Institutul are un binemeritat prestigiu şi-n acest prestigiu este chiar viaţa noastră, a întregii familii de cercetători de aici. Pe Simionești putem să-i ignorăm, dacă asta doreşte nu ştiu cine, dar de Institutul de Biologie şi Patologie Celulară nimeni nu poate face abstracţie. El şi-a câştigat o poziţie fermă în elita disciplinei. Iată, am la îndemână o analiză făcută de o revista americană, Genetic Engineering News, unde se consideră că în anii regimului Ceausescu, practic, în România a existat un singur institut de prestigiu. Scrie pe larg aici, între alte afirmaţii pozitive: "The U.S. National Institutes of Health (NIH) and NSF have been supporting Romania's Institute for Cellular Biology and Pathology (ICBP) since 1980 with the only U.S. grant given to a Eastern European country. The ICBP was founded by Dr. Nicolae Simionescu and his wife, Dr. Maya Simionescu, who are cell biologists with world-class reputations

in cardiovascular research. Both were faculty members of the Rockefeller University and Yale before organizing the Institute. The Simionescus' current publications report work on the cell biology of atherogenesis, the role of endothelial cells in hypercholesterolemia and platelet structure - function relationships. The ICPB stands as an exception to the rest of Romanian science which, during the Ceaucescu regime, was ruled by the dictators' wife, Elena…"

Un lucru interesant, în anii respectivi, a fost acela că, deși noi înșine aveam tot mai mari dificultăți cu ieșirea din țară, în urma a tot soiul de lupte, care durau câteodată un an sau chiar doi ani de zile, am reușit să trimitem foarte mulți oameni din institut în străinătate. Și, ceea ce e remarcabil, este că în acei ani nu a rămas nimeni afară. Ajunsesem, într-un anume fel, să fim, poate, singura instituție din România din care nu "dezertase" nimeni. Acest fapt a constituit pentru mine un atu foarte important când mă luptam pentru oamenii mei. Toate piedicile, ba că nu-i membru de partid, ba că e soră-sa sau frate-său sau nu știu ce unchi sau mătușa pe nu știu unde, în nu știu ce țară ș.a.m.d., le înlăturam pe rând cu acest argument infailibil: nici unul din cercetatorii noștrii trimiși peste graniță nu a rămas acolo, ci a revenit, la termenele respective, la cuib, la institutul mamă. Formula găsită de Maya și folosită intr-un interviu, pentru a exprima aceasta situație, a fost una foarte potrivită: "to beat the system" - "să batem sistemul". Și prin activitatea, și prin rezultatele noastre tocmai acest lucru l-am realizat.

Curios este că dupa Revoluție, o parte din cei care au luptat alături de noi, au preferat, de data aceasta, să rămână în străinătate. S-a întâmplat, în orice caz, un fenomen psihologic foarte curios. Oamenii considerau că am batut sistemul și nu mai vor să lupte, în condițiile actuale, cu dificultățile. Și fiecare vrea să se relaxeze mai mult, să plece, și încă definitiv, în străinătate. Înțelegeți dv., aceeași oameni care au rezistat ani în șir alături de noi în epoca lui Ceaușescu, acum spun: "M-am săturat. Am ajuns la 40 de ani, am luptat alături de dv., credeam într-o idee. Dv. ați fost totdeauna un poet, ne-ați fascinat zece ani de zile și am trăit in aceeași casă, dar acum a rămâne în țară, în brambureala asta, e un sacrificiu inutil. Plec să câștig niște bani, să-mi fac o viață mai bună. Lipsesc câțiva ani de zile poate și mă întorc după aceea." O să vedem dacă se vor mai întoarce. Să sperăm că o vor face.

NT - Institutul de Biologie și Patologie Celulară din București merge însă înainte...

NS - Meritul enorm este că el a supraviețuit, că există aici.

NT - A fost, și a rămas și azi, un punct de atracție pentru o serie de personalități din străinătate când sosesc în România.

NS - La noi a venit foarte multă lume. Sosiți chiar pentru cu totul alte probleme la București, numeroși oameni au ținut să vadă institutul, să ne cunoaștem. Îmi aduc aminte, de pildă, că unul din directorii generali de la National Science Fundation,

Glenn Schwaitzer, când a ieşit din clădire, mi-a mărturisit: "Nicolae, ştii care este feeling-ul meu despre institutul vostru? Că sunteti al 52-lea stat al S.U.A." Era surprins că am reuşit, în ambianţa generală din trecut, să menţinem Institutul nostru ca o oază.

NT - Mirarea domniei sale era absolut întemeiată...

NS - Vedeţi dv., d-le Ţone, în toată această vreme n-am dat nimănui nici un interviu. N-am vrut să apărem niciodată la televiziune. N-am vrut să scriem nici un articol despre institut, solicitat de propaganda oficială. N-am facilitat, n-am cerut nici un fel de vizită la noi când toata lumea ne spunea: "Chemaţi-o pe Doamna Cutare" ori: "Invitaţi-l pe Preşedinte". N-a călcat nici un nepoftit cu piciorul aici. Poate că, în acest fel, nici nu prea s-a ştiut exact cu ce ne ocupăm noi. Şi anii au trecut şi noi ne- am văzut de ale noastre.

"SENTIMENTELE PENTRU UN OM DE CALIBRUL LUI PALADE TREBUIE SĂ RĂMÂNĂ DE O ÎNALTĂ PURITATE"

NT - Am ajuns, iată, din aproape în aproape, şi la ultima întrebare a dialogului nostru. Cum îl vedeţi dv., ca personalitate ştiinţifică în secolul acesta, pe George Emil Palade?

NS - Profesorul Palade este, în felul lui, un unicat, fără doar şi poate - şi perceptia mea în ceea ce-l priveşte are parametri multipli, pentru că, practic, interacţionez cu el foarte strâns de 23 de ani, şi pot spune că-l cunosc mai bine decât mulţi alţii. Şi concluzia aceasta capătă tot mai multă consistenţă pe măsură ce trece timpul. Ne-am revăzut ultima dată cu el de curând, în decembrie 1992, când a venit să-şi petreacă o seara la noi, la New York. Şi anul acesta ne-a invitat să-l vizităm, să stăm mai mult timp împreună. Mai avem încă de lucru la nişte proiecte comune. El este, deci, un exemplar unic, o veritabilă "rara avis". Luat în totalitate, Palade reprezintă unul dintre marii oameni de ştiinţă ai secolului. Personalitatea sa este una a profunzimilor, omul de ştiinţă completându-se armonios cu omul de cultură, cu omul dăruit cu o mulţime de alte talente. Este, dacă pot spune aşa, un campion al decenţei şi dacă-l respecţi, dacă-l iubeşti pe Palade, trebuie să-l lasi pur şi simplu în lumea lui şi nu să-l expui în tot felul de show-uri, cum fac în prezent la noi unii care, vorba poetului, pentru a se preamări pe ei, şi-au adus aminte peste noapte, că Palade există pentru România.
Avem datoria să-l protejăm, dacă chiar îl iubim, de asemenea show- uri propagandistice. Orice exagerare de felul acesta, al spectacolului gratuit, sunt sigur că nu-i este nici lui agreabilă. Şi, repet, dacă într-adevăr îl simţi ca grandoare umană pe Palade, se cuvine să nu ieşi, în nici un chip, din decenţa, din civilitatea care-i sunt atât de proprii. Sentimentele pentru un om de calibrul lui Palade trebuie să rămână de o înaltă puritate. Palade nu are nevoie de titluri de complezenţă din partea unor asa-zise persoane de vază care abia dacă-i pronunţă bine numele. Palade nu are nevoie de

astfel de titluri. Palade are nevoie de un respect profund și genuin. Lăsați-l în pace pe Palade cu titlurile propagandistice. Ele nu fac decât să-i adauge o pojghiță care nu i se potrivește. Palade nu are nevoie de decorații cotidiene din partea celor care până mai ieri - alaltăieri se prefăceau că n-au auzit de reputația sa universală. Așa gândesc eu. Nu știu dacă și Maya are aceleași convingeri cu privire la festivismul sec care se practică de la o vreme în privinta profesorului. Ne considerăm, însă, amândoi, niște privilegiați pentru faptul că am avut norocul să ne formăm alături de el. Aceasta pe de o parte. Pe de altă parte, îl considerăm unul dintre oamenii cei mai apropiați de inima noastră. Îl cunoaștem de aproape două decenii și ne-am înțeles și ne înțelegem foarte bine și, de aceea, aprecierile noastre în privința sa au mers totdeauna cu mult dincolo de Palade-care-a-luat-Premiul-Nobel. Pentru noi, el nu este numai un simbol, ci este și trebuie să devină pentru tot mai mulți oameni de aici, de acasă, un argument major al emancipării științifice și, deopotrivă, morale. Este cel putin bizar că influența sa asupra dezvoltării științei, asupra dezvoltării cercetării fundamentale în România nu are cursul scontat.

A venit, l-au decorat, l-au facut cetățean de onoare, a plecat și cu asta gata. Lucrurile au rămas tot cum au fost inițial.

Nu credeți că este, în sfârșit, timpul să-l descoperim cu adevărat pe Palade? Și, mai ales, să-l prețuim cu adevărat ?

București, aprilie 1993

POLITICA ȘTIINȚEI ÎN VIZIUNEA PROFESORULUI NICOLAE SIMIONESCU

ACADEMIA – MAXIMA SCIENTIA ET MAXIMA MORALIA
MAYA SIMIONESCU, NICOLAE SIMIONESCU

ARTICOL APĂRUT ÎN REVISTA „ACADEMICA" NR. 6, 1991

În primul său an de eforturi de reorganizare, Academia Română și-a concentrat majoritatea activității – în mare măsură inerent – în acțiuni de reparare a unor injusteți, comemorări și primiri de noi membri. Acum a venit timpul ca Academia să se ocupe de viitorul ei cu tot ceea ce și-a asumat să facă pentru ea, pentru cele 54 unități de cercetare pe care le-a preluat și pentru Comunitatea Științifică pe care o reprezintă. De mai multe decenii aceasta din urma a fost privată de sentimentul reconfortant de a se uita de jos în sus la forul suprem al culturii și științei românești. Conturarea precisă a felului în care Academia Română înțelege să-și proiecteze și substanțieze viitorul ei și al domeniilor pe care le patronează, ar trebui să fie însăși sensul și mesajul Comemorării a 125 de ani de activitate. Impactul deosebit pe care această unică instituție îl poate avea pentru România de mâine, reclamă deopotrivă aduceri aminte cât și marcată proiectare în viitor.
Dintre multiplele și variatele probleme pe care considerăm că Academia (înțelegând prin aceasta toți membrii ei) este datoare și are capacitatea de a le rezolva în viitorul imediat dorim să subliniem câteva. Ne vom referi în mod special la domeniul științelor.

A. ACADEMIA ESTE EMANAȚIE ȘI PARTE A COMUNITĂȚII ȘTIINȚIFICE

În activitatea ei curentă, Academia Română trebuie să reflecte în mod convingător că se conduce după ideea că nu este un izolat autoprodus, ci o parte, o emanație a Comunității Științifice (care își merită în egală măsură început numele cu litere mari). De opinia acestei comunități trebuie să se țină seama în orice acțiune, începând cu primirea de noi membri și mergand până la elaborarea noilor reglementări privind cercetarea științifică și statutul cercetătorului. Când o semnificativă fracțiune a Comunității Științifice extramurale își exprimă indoieli sau dezacordul față de unele acțiuni ale Academiei, se așteaptă ca aceasta să reacționeze corespunzător, pentru a nu-și altera sau pierde suportul moral al intelectualității pe care o reprezintă.
Cu cât o țară a atins un nivel mai ridicat de performanță științifică, cu atât este mai largă, mai vie și mai productivă osmoza bidirecțională dintre Comunitatea Stiintifica si organismele de promovare a efortului de cunoaștere și de consacrare a făuritorilor de cultură. Sunt numeroase exemple (Statele Unite ale Americii, Japonia, Suedia, Germania, Finlanda și altele), care reflectă ideea de bază fiind că activitatea unei academii nu este o treabă exclusivă a membrilor ei, ci a întregii Comunități Științifice.

B. NECESITATEA UNUI SISTEM DE CRITERII OBIECTIVE PENTRU EVALUAREA UNEI CANDIDATURI

Este cunoscut modul abuziv și regretabil prin care, în ultimele decenii, unele primiri în Academia Română s-au făcut pe merite predominant sau exclusiv politice. În prezent, asemenea academiilor de științe din țările avansate, Academia Română trebuie de urgență să emită un Sistem de Criterii Obiective care să permită analiza și evaluarea corectă a activității științifice a unui candidat. Este singurul mod prin care se poate evita subiectivismul și evaluări făcute sub impulsul simpatiilor sau al antipațiilor personale.

Desigur, criteriile urmează să fie particularizate conform cu specificul fiecărui domeniu.

După un astfel de sistem ar urma să se conducă atât instituțiile care propun, cât și secțiile Academiei Române care evaluează oportunitatea unei candidaturi.

În mișcarea științifică internațională s-au conturat clar o serie de criterii unanim admise și consecvent aplicate. Ele operează atât la primirea într-o academie de știință, cât și la promovări în gradul de profesor, profesor asociat sau șef de departament (chairman). În universitățile de renume în care activitatea științifică este o prestație esențială pentru promovarea la gradul de chairman ori profesor, doar activitatea didactică – oricât de apreciată ar fi – este insuficientă dacă nu este dublată de cea de scientist.

Desigur, revine conducerii Academiei rolul de a organiza urgenta elaborare și folosire a unui astfel de sistem; noi vrem doar să subliniem unele din criteriile cheie intrate în mecanismele de lucru uzuale ale academiilor de prestigiu.

1. Evaluarea activității științifice a unui candidat trebuie făcută de specialiști din Academie sau/și din afara ei.

Acest "peer review" (asupra caruia insista și Profesorul Michael Sela de la Institutul Weizmann din Rehovot, în recentul său discurs ținut în aula Academiei Române) incumbă o mare responsabilitate din partea celor ce-l efectuează. De regulă, acestia sunt 2-3 experți, în cazuri mai deosebite apelându-se și la specialiști din străinătate. Fără o astfel de evaluare de specialitate, supunerea unei candidaturi votului Adunării Generale a fost și este principial invalidă.

2. Propunerea și invalidarea candidaturilor.

Odată evaluările formulate în scris, propunerile sunt examinate în secția de profil. Aici apare o altă imperfecțiune organizatorică, deoarece potrivit actualului Statut al Academiei Române (Art.11, paragraful al doilea), "lista candidaților propuși de o secție, se stabilește prin vot secret cu majoritatea de 2/3 din numărul total al membrilor titulari ai secției respective". Cu alte cuvinte, în mod arbitrar, membrii corespondenți nu au dreptul de a vota propunerea unui nou candidat. Situația devine și mai serioasă în unele situații, ca de pildă cea de Științe istorice, în care exista 3 membri titulari și 10 membri corespondenți; probabil că mai sunt și alte exemple similare.

În etapa următoare a acestui mecanism, anume cea a Adunării Generale, membrii corespondenți (unii nou intrați, altii în aceasta poziție de unul-două decenii) sunt din nou privați de a-si exprima opțiunile prin vot. Datorita inerenței heterogeneității a Adunării Generale rezultată din stricta specializare a membrilor titulari, aceștia sunt puși in cele mai multe cazuri în situatia de a vota formal candidați despre care cunosc foarte puțin sau nimic, în timp ce cei care îi cunosc nu au dreptul să voteze pentru simplul motiv că sunt "doar": membri corespondenți. Aceștia din urma, primiți în Academie pentru merite științifice, dar și in scopul infuziei unui spirit modern, sunt în mare măsură reduși, fără nici o bază reală, la un rol de spectatori. Ei pot fi consultați, solicitați să participe la unele acțiuni, dar ținuți în afara mecanismului de luare a deciziilor. Curioasă treabă și greu de imaginat cum se va putea astfel reprimeni activitatea Academiei noastre.

Ca să întregească șirul contradicțiilor, articolul 59 din Statut dă și membrilor corespondenți dreptul de a vota o eventuală modificare a Statutului.

Considerăm că o analiză obiectivă și responsabilă a unor prevederi din actualul Statut va convinge Prezidiul Academiei Române (cât și pe membrii ei), că o astfel de modificare cât și a altor prevederi preluate din vechiul statut se impune în mod presant în cursul acestui an.

3. „Generația calendaristică" vs. „generația științifică".

Aici se impune o precizare. Spiritul nou și concepția modernă asupra cercetării și organizării ei nu sunt un atribut exclusiv al „generațiilor mai tinere". Prin pregătire, experiență, condiții de lucru, calități personale, potențial biologic și performanță profesională, fiecare dintre noi poate fi definit și prin doi parametri care reflectă apartenența la o anumită „generație": generația biologică și generatia științifică. Generatia biologică (calendaristică) se dovedește, în unele cazuri, a fi neesențială, cum este exemplul unor eminenți oameni de știință ca Profesorul Stefan Milcu sau Profesorul George Palade (și exemplele sunt numeroase). Beneficiari ai unei structuri biologice și intelectuale de excepție, prin felul în care gândesc și acționează ei au aparținut și aparțin în continuare generației științifice tinere, de avangardă. Cât de relativ este impactul generației biologice asupra performanței profesionale se poate vedea și în strălucitele exemple din alte domenii ca cele ale artei și culturii (P. Picasso, P. Cassals, A. Rubinstein, A. Horowitz ș.a.).

4. Unele criterii obiective de evaluare a activității științifice.

Conform precizării din articolul 7 al Statutului Academiei, membrii ei sunt aleși dintre oamenii de știință și cultură de înaltă ținută morală și cetățenească care s-au distins prin lucrări originale de mare valoare (sublinierile ne aparțin).

Cu excepția unor cazuri notorii, în general, parametrii morali și cetățenești sunt dificil de evaluat pe criterii inatacabile. Pentru activitatea științfică însă există o serie de criterii acceptate unanim, dintre care ne vom referi doar la câteva.

(a) Lucrări originale publicate și omologate internațional. O valoare convingătoare o au lucrările publicate în reviste internaționale de prestigiu care folosesc sistemul referenților. În prezent, este imposibil ca o descoperire științifică

publicată în limba română să aibă impactul pe care îl merită în domeniul respectiv. (Problema revistelor românești care publica articole în limbi străine a ajuns, pentru majoritatea publicațiilor, într-un impas care necesită o analiză separată). Știința are un pronunțat caracter integrativ internațional. Dinamica și ritmul informației științifice contemporane nu numai că se deosebesc fundamental de cele ale secolului trecut, dar se schimbă de la un deceniu la altul.

(b) Citarea în literatura de specialitate. Atestarea valorii unei lucrări publicate în străinătate se face printr-un lant de reacții: acceptarea de către recenzori, numărul de cereri de extrase și, mai ales citarea în literatura domeniului respectiv sau în cele colaterale. Dacă o lucrare a trecut neobservată de colegii din domeniu, valoarea ei științifică rămâne, cel puțin pentru un timp, îndoielnică. Cazuri de redescoperire în literatură a unei lucrări importante vreme îndelungată ignorată, sunt astăzi potențial extrem de rare. În multe domenii există în prezent publicații speciale care redau detaliat fiecare citare a unei lucrări publicate. Pentru biomedicina apare la Washington D.C. (SUA) cunoscutul "Citation Index", în care nu numai forurile de consacrare, dar și fiecare cercetător își poate vedea răsunetul avut de un anumit articol. Unele institute din străinătate (Japonia, SUA, Canada, Germania, Israel, Ungaria ș.a.) practică salarizarea diferențiată a cercetătorilor după numărul de citări semnalate în Citation Index. Este imperios ca astfel de publicații să fie constant asigurate de Biblioteca Academiei Române sau de alte biblioteci centrale sau de profil. Ideea de bază este că sunt mai semnificative 100 de citări ale unei singure lucrări decât 100 de lucrări necitate. Aceasta simplifică hotărâtor lungile liste de lucrări care nu au avut un impact în literatura domeniului respectiv.

(c) Tratatele, manualele și monografiile. Cu excepția cazurilor în care sunt reflectate semnificativ propriile contribuții originale, tratatele și monografiile bazate exclusiv pe compilații, au o valoare exclusiv informativă sau didactică; ele nu sunt considerate contribuții științifice. Există numeroși renumiți autori de tratate ajunse "clasice", dar care nu au cerut și nu aparțin nici unei academii de științe. În aceeași categorie intră și cărțile editate, din care o valoare științifică evaluabilă pot avea numai capitolele scrise de editor(i), bineînțeles, dacă sunt bazate pe contribuții originale deja atestate. Nici acest gen de publicatii nu sunt considerate opera științifică, indiferent pe câte volume se întind.

(d) Alte forme ale recunoașterii internaționale. Odată ce producția științifică a unui cercetător este inserată îin mișcarea națională și internațională, se declanșează etape succesive de includere a lui progresivă în familia din ce în ce mai restrânsă a experților mondiali ai acelui domeniu ("recognized world expert in..."). Pe acest lanț de atestări se inseră invitarea ca raportor, chairman sau organizator al unor congrese internaționale, sau ca "Invited Lecturer" sau "Visiting Professor" chemat să-și comunice experiența studenților și corpului didactic și de cercetare de la diverse universități. O etapă și mai avansată este solicitarea drept consultant pentru acordarea de grant-uri străine sau promovări ale unor profesori ori șefi de unități. Evident, recunoașterea atinge etape și mai inalte atunci când propria comunitate

științifică internațională onorează pe cercetătorul respectiv cu distincții și premii științifice de prestigiu. La baza acestei elaborate desfășurări a unei recunoașteri internaționale, nu rareori lipsite de meandre, dar, de regulă, netarată de improvizații, stă inconfundabil valoarea descoperirilor și a conceptelor științifice originale pe care cercetătorul le-a adăugat patrimoniului cunoașterii și culturii universale.

C. PRIMIREA DE TINERI SCIENTIȘTI

În principiu, toată lumea este de acord sau chiar pledează pentru necesitatea "întineririi" Academiei Române, înțelegând prin tinerețea scientiștilor nu atât vărsta lor, ci apartenența lor activă la domeniile de vârf actuale ale științei. Apare ca reconfortantă și generatoare de optimism perspectiva unei îmbinări fertile între scientiști cu responsabilă experiență și contribuții științifice și mai tinerii – dar deseori la fel de calificați – cercetători, făuritorii de azi ai științei. Din păcate (căci nu e vorba de nefericire), până acum includerea în Academia Română a unor tineri cercetători activi a fost modestă, nesemnificativ practicată. Mai mult, datorită prevederilor actualului Statut, cei noi primiți ca "membri corespondenți" (ce semnificație are azi un astfel de termen?) sunt excluși din mecanismul decizional, tocmai ei de la care se așteaptă idei și hotărâri menite să asigure modernizarea și pe plan național și internațional a acestei instituții, față de care mulți au încă serioase rezerve.
În primirea de noi membri, Academia Română ar trebui să fie ca Janus, zeul roman patron al tuturor începuturilor, dar și al tuturor sfârșiturilor – cu o față să privească înapoi spre creatorii de știinta și cultură de ieri, pe care să-i consacre – cu cealaltă față să scruteze înainte pentru a identifica mințile tinere creatoare, capabile să ducă mai departe pe o orbită superioară viitorul acestei Academii.
O grijă deosebită trebuie pusă în aflarea și interesarea în activitatea Academiei a acelor tinere talente infestate de pasiune și putere de creație, dar care prin natura lor sunt modeste, retrase sau poate chiar neîncrezătoare. Ele sunt elita științifică de mâine, care trebuie emulată și protejată. Să nu ne lăsăm intimidați de cei agresivi, de cei care încearcă să forțeze cu zgomot porțile Academiei.
Inclusiv în Academia Română, tinerii scientiști trebuie să fie folosiți cu depline drepturi în impulsionarea de care este atâta nevoie. De altfel, academiile de știință din țările avansate nu au membri corespondenți, o rigidă preluare, din mai vechi și indoielnice surse de inspirație pentru instituțiile din țara noastră. Gradina lui Academus are nevoie de seva proaspată. Acesta este singurul mod prin care rigidizanta homeostazie poate lăsa loc unei reale RHEOSTAZII, care implică mișcare și reînnoire.

D. PROIECTUL NOII LEGI A CERCETĂRII TREBUIE PREZENTAT SPRE DEZBATERE COMUNITĂȚII ȘTIINȚIFICE

Conducerea Academiei Române a participat în mod hotărător la elaborarea Proiectului acestei noi reglementări atât de mult și atâta timp așteptat de Comunitatea Științifică.

Ajuns în faza prefinală, acest proiect trebuie în mod obligatoriu să fie supus dezbaterii prin publicarea lui în presă și trimiterea pentru examinare și sugestii la toate unitățile de cercetare, proiectare și învățământ universitar.

Un material de o astfel de importanță nu trebuie elaborat fără larga consultare a cercetătorilor, dat la aprobare forurilor legislative și apoi Comunitatea Științifică pusă în fața unui fapt împlinit, eventual spunându-i-se pur și simplu: "Acta est fabula!". În mod special este imperios necesar input-ul cercetătorilor tineri pentru că, în fond, ei vor trăi în condițiile stipulate – fără consultarea lor – în acest Regulament.

Păstrăm nădejdea și optimismul că Academia Română își va comemora cei 125 de ani de existență privind înainte printr-un nou mod de a gândi și lucra conform coordonatelor actuale ale vieții științifice, prin îmbunătățirea Statutului și prin îmbogățirea patrimoniului său uman cu cercetători și creatori de valoare.

QUO VADIS, ACADEMIA?
O NOUĂ RUBRICĂ ÎN REVISTA "ACADEMICA"
INIȚIATĂ DE PROF. NICOLAE SIMIONESCU

QUO VADIS, ACADEMIA?

ACAD. NICOLAE SIMIONESCU,
VICEPREȘEDINTE AL ACADEMIEI ROMÂNE
ARTICOL AAPĂRUT ÎN REVISTA "ACADEMICA" NR. 8, 1994

PROMOVAREA UNEI POLITICI MODERNE ÎN ABORDAREA CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE ROMÂNEȘTI

ACȚIUNI VIZÂND ÎMBUNĂTĂȚIREA CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE ÎN ACADEMIA ROMÂNĂ

De ce este necesară îmbunătățirea Cercetării Științifice în Academia Română? Este de notorietate faptul că știința contemporană avansează într-un ritm extrem de alert la care toate comunitățile științifice fac un deosebit efort de a se racorda. Chiar dacă cercetarea științifică (CS) în Academia Română (AR) ar merge excelent, totuși prin natura și scopurile ei în permanentă adaptare, activitatea de cercetare se cere în continuare ameliorată. Din păcate însă, datorită unui complex de motive, Cercetarea în AR nu atinge decât în puține domenii performanțele la care o îndreptățește potențialul intelectual al acestei instituții. Îmbunătățirea CS reclamă unele reconsiderări în mentalitate, management, structura instituțională, mecanisme de finanțare etc. Dacă nu facem un efort să modernizăm și să revitalizăm CS în AR, fără voia noastră, vom fi părtași la pericolul grav al perpetuării și adâncirii decalajelor tehnologice și de competitivitate ale României și prin asta la pierderea identității patrimoniului intelectual românesc în cadrul comunității științifice internaționale.

Modernizarea condițiilor de lucru și asigurarea nivelului de trai corespunzător misiunii sociale a omului de știință, este cel mai bun remediu al "brain-drain-ului", pentru prevenirea căruia, din păcate, nu se întreprinde nimic. Așa cum recent ne-a precizat Banca Mondială, orice potential sprijin financiar extern este condiționat de o reforma semnificativă a CS în care - după părerea experților externi - dealtfel împărtășită și de mulți dintre noi - elementele cheie sunt: coerența intelectuală a rețelei de cercetare proprii; formarea adecvată a noii generații de cercetători; redimensionarea sistemului instituțional; finanțarea cercetării științifice prin sisteme competitive.

Desigur, suntem conștienți că România trece printr-o profundă criză economico-socială, dar în cadrul ei, cea mai gravă este criza științei și culturii, incertitudinea supraviețuirii școlilor și a centrelor de excelență. De aceea, este esențială luarea urgentă de Decizii Politice care să ateste concret că, chiar și într-o perioadă de declin economic, sprijinirea cercetării fundamentale este o datorie morală a Statului.

Investiția constantă în Științele de Bază și în formarea noii generații de scientiști este cea mai lucidă și mai sigură investiție în viitor. În această strategie națională, Academiei Române îi revine responsabilul rol de custode și promotor. Dar, pentru a-și îndeplini convingător această funcție, Academia Română însăși trebuie să-și îmbunătățească și să-și modernizeze propria activitate de cercetare. Realizăm deosebita importanță și responsabilitate a unor astfel de acțiuni, faptul că este vorba de un proces complex, care trebuie să meargă gradat, care va cere timp, imaginație și înțelepciune, cu inerente dificultăți (din afara Academiei, și speram, ceva mai puține din interiorul ei) și că toate măsurile trebuie judicios adaptate specificului diferitelor domenii ale științei. Dar, pe firul continuității valoroaselor nostre tradiții, avem datoria morală să încercăm să asigurăm ascensiunea în spirală ilustrată metaforic de Salieri, dar și să stimulam apariția a cât mai mulți Mozart.

Materialul de față reprezintă o primă formă a unui set de propuneri în acest sens; el a fost aprobat în unanimitate atât de Prezidiu cât și de Adunarea Generală a Academiei Române (10-11 mai 1994). Propunerile rămân însă în continuare deschise sugestiilor tuturor celor interesați în progresul Academiei Române și care doresc să participe activ la realizarea lui. Înscrierea în Grupele de Lucru a unui impresionant număr de colegi relevă o promițătoare angajare în aceste acțiuni a căror finalizare nu se poate face decât printr-un susținut și constructiv efort comun.

MANAGEMENTUL GENERAL

Adăugarea de funcții noi

Alături de funcțiile sale actuale (for suprem de consacrare cultural-științifică, efectuarea de cercetări fundamentale și avansate și rolul social-științific legat de problemele societății românesti), este necesar ca Academia Română să-și adauge trei noi importante activități:

(1) Participarea la învățământul superior, educația în știință a tineretului și formarea cercetătorilor:

(a) Numărul mare de cercetători cu deosebită competență de specialitate din institutele AR, trebuie folosiți în învățământul universitar spre beneficiul studenților. Aceasta se poate realiza prin cumul pe funcții de profesori asociați.

(b) Prin perceperea corectă a rolului covârșitor pe care știința îl va juca în mileniul trei, marile academii (SUA, Japonia, Anglia, etc.) și-au inclus ca obiectiv major educația în știință a populației și îndeosebi a tinerilor începând cu cei din liceu (vezi repetatele pledoarii ale lui Bruce Alberts, noul Președinte al National Academy of Science - USA). Academia Română își poate alcătui relativ curând un program concret în acest sens fiind una dintre acele puține inițiative care nu "costă bani".

(c) Participarea la formarea tinerilor cercetători.

(2) Finanțarea extramurală prin sisteme competitive deschise: Academia Română trebuie să devină una din sursele principale de stimulare a cercetărilor fundamentale de mare relevanță științifică indi¬ferent unde s-ar desfășura acestea. Pentru asta AR urmează să-și includă în bugetul anual o fracțiune destinată finanțării pe baza competiției a unor valoroase propuneri de cercetare venite din universități, institute extra-academice etc. AR are în prezent și în continuare își poate perfecționa mecanismele de evaluare de înaltă obiectivitate și responsabilitate, reclamate de un astfel de sistem de orizont național. Acest mecanism urmează să fie coordonat (selectare de domenii) cu cel folosit de Fondul Român pentru Cercetare proiectat pentru Fundația Română pentru Știință. Numeroase academii folosesc extensiv și cu deosebit succes finanțarea extramurală.

(3) Consultant al organismelor de Stat în Știință și Cultură: După cum se întâmpla în unele țări avansate, AR trebuie să atingă un astfel de prestigiu, încât forurile de Stat să o consulte în orice actiune ce privește direct sau indirect cultură și știință românească. Consultanța ar trebui să se întindă de la elaborarea actelor normative aferente și până la numirea miniștrilor de resort, atașaților culturali-științifici ai ambasadelor și ai centrelor culturale din străinătate.
Principii manageriale majore:
(i) Asigurarea competenței manageriale la diferite niveluri de organizare a CS în AR;
(ii) Descentralizarea institutionala și operațională;
(iii) Selectarea domeniilor și direcțiilor prioritare;
(iv) Evaluarea periodică a institutelor și cercetătorilor;
(v) Finanțarea predominant prin sisteme competitive = cel mai eficient mod de evaluare;
(vi) Protejarea valorilor individuale și a centrelor de excelență;
(vii) Simbioza funcționaă cu universitățile și alte unități de cercetare;
(viii) Internaționalizare prin cooperare.

Scopul final: Cunoaștere, Competență, Excelență.

SISTEMUL INSTITUȚIONAL

SITUAȚIA ACTUALĂ

Prin felul în care a fost tratată de regimul comunist, Academia Română are o istorie unică. În 1948 a fost desființată și înlocuită cu Academia Republicii Socialiste România, organizată după modelul sovietic, în care peste 100 de foști membri au fost excluși și înlocuiți cu unii conducători comuniști de îndoielnică valoare. Demolarea s-a definitivat în anii '60 prin desființarea institutelor de cercetare sau înglobarea lor în sectoarele economico-industriale.

Ca urmare a acestor aberaţii, anul 1989 găseşte în celelalte ţări Centrale şi Est-Europene, inclusiv în Rusia, Academii relativ puternice. În schimb, Academia Română a trebuit refăcută fizic şi moral printr-un prelungit şi deloc simplu proces, al cărui succes este meritul conducerii ei din perioada 1990-1993 şi îndeosebi al preşedintelui Acad. Mihai Drăgănescu. Revine noii conduceri a AR datoria de a duce pe o orbită superioară, modernă, prestaţiile acestei instituţii de mare responsabilitate în prezervarea şi perpetuarea spiritualităţii româneşti. Prezentul plan de acţiuni încearcă să raspună acestei obligaţii morale.

Un alt fapt de remarcat este acela că în ţările amintite, nici înainte şi nici în prezent, nici o Academie nu şi-a transferat institutele în alte reţele. În prezent, organizarea instituţională a diverselor Academii este deosebit de heterogenă, niciuna dintre ele neconstituind un model demn de imitat ca atare. Prin organizarea şi functionarea ei, probabil structura cea mai apropiată de ceea ce se potriveşte Academiei Române, ar fi cea a Societăţii Max-Planck din Germania. Înfiinţată în 1948, ca succesoare directă a Societăţii Kaiser-Wilhelm-Gesellschaft, Societatea Max-Planck (MPG) a avut de la început rolul de a aborda domeniile de cercetare ce nu pot fi în mod adecvat abordate în cadrul universităţilor. Astfel, cele 57 de institute (plus 5 în curs de organizare) nu rivalizează cu universităţile, ci completează activitatea acestora. Mai mult, MPG a organizat recent 28 de grupuri de cercetare pe perioade limitate implantate în universităţi şi institute aparţinând altor sectoare. MPG, cu o autonomie totală, este aproape în totalitate finanţată de la buget, doar o unică fracţie provenind din venituri proprii.

PLAN DE ACŢIUNI (1994-1995)

(a) Definitivarea auditării unităţilor de cercetare ale AR: proiecte, conducerea, cercetătorii, tehnologii, performanţe; propuneri pentru reorganizarea eficientă a reţelei instituţionale a AR. Aceasta acţiune este hotărâtoare pentru viitorul AR. Începu¬tă în 1992, evaluarea unităţilor de cercetare (UC) ale AR a fost imediat continuată încă din februarie 1994 prin difuzarea unui formular complex prin care aproape toate UC au furnizat date necesare procesului de evaluare. Acesta va intra într-o etapă nouă, astfel încât la sfârşitul anului 1994 să poată fi avansate propuneri pentru eventuale reorganizări. Mecanismele de evaluare sunt în concordanţă cu normele internaţionale, auditarea instituţională fiind un punct central al reformei cercetării ştiinţifice din numeroase ţări ale lumii. În ţările foste comuniste, auditarea institutelor academice a dus la închiderea a 30% din institute în Cehia şi la reducerea cu 50% a personalului în alte 59 de institute. Academia Poloneză de Ştiinţe şi-a reorganizat 23 din cele 83 de UC proprii. De remarcat că dintre cele 585 UC din universităţi, numai 20 au obţinut un grad de evaluare la nivelul celor din Academia Poloneză. Academia de Ştiinţe a Ungariei a folosit şi experţi străini în comisiile de evaluare. În general, institutele acesteia sunt conduse şi finantate ca cele ale MPG.

Experţii străini s-au oferit să participe şi în comisiile de evalulare ale AR.
(b) Ocuparea prin concurs a posturilor de director. Întrucât actualii conducători ai UC ai AR au fost "numiţi" în funcţie după 1992, s-a cerut de către un mare număr de academicieni, cât şi de Federaţia Sindicatelor din AR ca toate funcţiile de directori să fie scoase la concurs. Această acţiune, al cărui cadru legal este încă în dezbatere, ar avea potenţial darul de a asigura UC expertiza managerială şi competenţa profesională cea mai calificată, atribute esenţiale pentru succesul reorganizării şi modernizarii CS în AR. În cadrul legislaţiei actuale, AR pe baza autonomiei sale, urmează să-şi definească organizarea acestor concursuri. Odată normalizate unele situaţii, conform practicii internaţionale, toate UC inclusiv conducerea lor (directori, consilii ştiinţifice) urmează a fi reevaluate periodic (4 ani).
(c) Dezvoltarea reţelei de informare şi a băncii de date. Un obiectiv convingător care nu necesită pledoarie sau explicaţii.
(d) Crearea de Grupuri de Cercetare extramurale.

PROIECTE DE CERCETARE: REZULTATE, VALORIFICARE

SITUAŢIA ACTUALĂ

Reflectând larga ei heterogeneitate instituţională, tematica de cercetare a AR are o mare diversitate. Această particularitate plus actualul sistem neconcludent de raportare a rezultatelor, face ca evaluarea performanţelor să fie deosebit de dificilă, iar finanţarea proiectelor "în continuare" să se facă de cele mai multe ori automat, fără nici o relaţie cu rezultatele obţinute (sau nu) în anul precedent. Prin natura lor, proiectele de cercetare sunt generate aproape exclusiv "bottom-up". Din analiza indicilor bibliometrici internaţionali reiese că cercetarea ştiinţifică românească, în ansamblul ei, nu ocupă o poziţie onorabilă (aşa cum ar îndreptăţi-o capacităţile intelectuale ale oamenilor de ştiinţă români).

PLAN DE ACŢIUNI (1994-1995)

Într-o ordine mai mult calendaristică decât a importanţei, sunt necesare un număr de măsuri concrete, ferm şi din timp aplicate în 1994, pentru a pregăti trecerea, din 1995, la un sistem mai eficient de organizare a planului de cercetare al AR.
(a) Elaborarea unui sistem eficient de raportare a rezultatelor si a utilizării fondurilor alocate
(b) Evaluarea "ex-post" a rezultatelor de către Grupuri de Specialişti special alcătuite în acest scop. Aceasta va orienta dacă finanţarea proiectului respectiv se va extinde şi în anul următor.
(c) Selectarea unor domenii prioritare în care AR este şi poate fi şi în continuare performantă la nivel internaţional. Este asteptat ca această acţiune, de mare

responsabilitate, să aibă un impact însemnat asupra structurii instituționale și a sistemelor de finanțare a CS din AR în 1995 și după accea.
Începând cu anul 1995 Planul de Cercetare al AR ar urma să fie constituit din mai multe tipuri de proiecte:
(i) Proiecte Individuale sau Colective finanțate prin granturi competitive;
(ii) Programe Instituționale sau Sectoriale (de interes național sau de domeniu) = finanțare globală de la buget (după evaluare de către grupuri de specialiști);
(iii) Participare la Programele Naționale Prioritare = finantate de Ministerul Cercetării și Tehnologiei;
(iv) Contracte extramurale = finanțate de beneficiari;
(v) Participare la granturile competitive ale Fondului Român pentru Cercetare.

AR trebuie să găsească formulele practice de stimulare a cercetărilor multi- sau interdisciplinare și a proiectelor din ce în ce mai mult susținute în țările avansate, denumite "Cercetări Fundamentale Direcționate" (Basic Targeted Research), un interesant hibrid între cercetarea fundamentală pură și cea aplicativă. Specialiștii din diverse domenii cunosc deja cadrul ideativ și metodologic al unor astfel de studii.

SISTEME DE FINANȚARE

SITUAȚIA ACTUALĂ

În perioada 1993-1994 s-au făcut deja primii pași de trecere de la finanțarea instituționala globală, la finanțarea de programe. Din numeroase motive, deopotrivă obiective și subiective, această aparentă schimbare are un caracter formal, nestimulativ și ineficient fiind în continuare grevat de nivelul extrem de scăzut al fondurilor alocate AR și cercetării fundamentale în general. Teza dupa care marea performanță financiară atinsă a fost aceea de asigurare a salariilor (și acela la un nivel vecin sărăciei) nu onorează nici pe oamenii de știință români și nici pe cei cărora le revine obligația morală de a sprijini corespunzător cercetarea științifică a acestei țări. În această situație agravată continuu și de dotarea tehnico-materială nesatisfăcătoare, trebuiesc căutate justificarea multor emigrări și poziția comparativ joasă pe care o ocupă azi majoritatea ramurilor științei românești. Un alt factor profund dăunător a fost nejustificata blocare a accesului institutelor AR la fondul special de 1%. La valorile la care a fost aprobat, bugetul AR pe 1994, coboară pe o și mai joasă treaptă. Ca exemplu, cele 400 milioane lei acordate pentru cheltuieli de capital (investiții) abia vor putea acoperi cumpărarea unui singur flow cytometer pentru toate cele 65 UC ale AR.

În acelasi timp, în țări vecine precum Cehia, pentru 1994 bugetul pentru știință a fost virtual dublat, iar în Bulgaria, în urma unei greve de tip japonez de două săptămâni, bugetul pentru știință a fost ridicat la 2% din PIB.

Comunitatea ştiinţifică din România priveşte cu consternare la faptul că în structura Bugetului de Stat încă nu există o fracţiune clar definită "Ştiinţă" (destinată în special cercetării fundamentale şi avansate).

În perioada 1994-1995 se va urmări crearea cadrului legislativ-normativ pentru:

(a) Îmbunătăţirea substanţială a salarizării cercetătorilor. Aş începe cu această acţiune datorită caracterului ei urgent şi hotărâtor pentru realizarea întregului plan de reformă a CS. Nimic, sau aproape nimic, din acest plan nu se va putea împlini, dacă făuritorii lui vor fi în continuare frustraţi material şi adeseori şi profesional. Asa cum s-a procedat şi cu alte categorii sociale, faţă de care scientiştii au rămas un paria, trebuie urgent efectuate creşterea categoriei, asigurarea surplusului de venituri din contracte, granturi, cursuri şi, în paralel, intro¬dusă salarizarea diferenţiată în raport cu performanţele ştiinţifice. În străinătate, sunt notorii exemplele de institute unde cercetătorii primesc salariile în raport cu numărul de citări în literatura internaţională.
(b) Restituirea patrimoniului Academei Române. De curând, a fost reînnoită solicitarea înaintată Senatului şi una similara va fi depusă la Camera Deputaţilor. Ambele camere manifestă un încurajator interes şi sprijin pentru rezolvarea corespunzătoare a acestei ilegalităţi a regimului comunist. Deşi se pun mari speranţe în recuperarea acestor importante bunuri, nu este exclus ca în primii ani dupa obţinerea lor, din motive de administrare, recondiţionare etc. beneficiile financiare reale să fie mult sub nivelul celor sperate.
(c) Introducerea sistemului de granturi competitive cu "peer review" cu implicarea în unele domenii şi a unor specialişti străini. În aceasta acţiune AR trebuie să joace rolul forului metodologic. Sistemul menţionat este folosit de câţiva ani în ţările din jur, experienţă cu acest mecanism având ţările cu ştiinţă avansată o vechime de cca. trei decenii.
(d) Participarea AR la înfiinţarea Fondului Român pentru Cercetare (FRC). Propus deja în diferite studii de politica ştiinţei în România, FRC este văzut ca un sistem autonom de granturi competitive individuale pe plan naţional deschis oricărei persoane cu neliniştea creativităţii, indiferent în ce domeniu. Singurul criteriu decisiv pentru finanţarea unor proiecte este potenţiala lor valoare ştiinţifică. Se discută încă dacă cea mai adecvată administrare a FRS ar fi AR sau un organ total autonom de restul reţelelor de cercetare cum este Fundaţia Română pentru Ştiinţă (FRS). Aceasta fundaţie, înfiinţată deja din 1992 sub preşedenţia de onoare a lui George E. Palade, având şi sediu, din motive neclare este încă total ignorată şi nebugetată de autorităţile de Stat.
(e) Introducerea sistemului de finanţare complexă. În acest sistem, bugetul AR ar urma să fie alcatuit din câteva componente corelate, dar cu valori şi destinatii specifice:

(i) bugetul de bază ("core budget") care să asigure salariile, întreţinerea infrastructurilor şi a echipamentelor în dotare, administrarea bunurilor existente;

(ii) fonduri pentru cercetarea propriu-zisă:
- pentru investiții și tehnica nouă,
- pentru materiale consumabile,
- pentru granturi competitive intramurale și extramurale;
(iii) fonduri pentru cooperări interacademice și internationale;
(iv) finanțare indirectă (scutiri de taxe, TVA, etc);

(f) Accesul cercetătorilor AR la fondul special de 1% și la orice sistem de finanțare pe bază competitivă.
(g) Asigurarea dreptului AR de a primi donații și sponsorizări din țară și străinătate.

RESURSELE UMANE

SITUAȚIA ACTUALĂ

O problema de mare complexitate, din care identific doar câteva aspecte ce se cer urgent analizate și rezolvate:
- Lipsa unui Statut al Cercetătorului care să așeze în cadrul adecvat parametrii sociali, materiali și profesionali ai celor ce-și dedică viața științei.
- Deteriorarea condițiilor tehnice de lucru plus salariile insuficiente au efecte negative atât asupra atracției tinerilor spre cariera științifică, cât și a formării viitorilor cercetători.
- Brain-drain-ul a crescut de la 4% în 1990 la 15% în 1993 afectând în special tinerii între 30 și 40 de ani.
- Dintre bursierii plecați pe variate durate de timp mulți nu s-au întors preferând deseori să lucreze pe posturi de tehni¬cieni.

Comparativ cu salariul mediu al unui cercetător echivalat cu cca 100$, în Ungaria salariul mediu este de 300-400$, iar indemnizatia academicienilor de cca 850$. În Bulgaria, după greva cercetătorilor, salariile au crescut cu 15-30%.

PLAN DE ACȚIUNI (1994-1995)

(a) Elaborarea unui program complex de formare a noii generații de cercetători. În cadrul acestuia, este necesar să fie introduse și:
(b) Un nou sistem de burse alcătuite dintr-un fond necesar specializării în străinătate, plus un fond pentru dotarea laboratorului la care urmează să revină în țară. Fără această ultimă componentă, bursierii își vor prelungi indefinit lucrul în străi¬nătate, în mod justificat neacceptând să revină la niște condiții ce nu le permit să performe în cariera aleasă.
(c) Salarizare diferențiată, premii și premieri conform cu realizările științifice.
(d) Legiferarea realizării de venituri adiționale (doctorat, contracte, granturi, cursuri, etc.)
(e) Contracte de angajare pe timp limitat, reînnoite anual. Este o practică extensiv

folosită în alte țări și de curând introdusă și în țările vecine (Cehia, Polonia, Ungaria). Se aplică categoriilor de cercetători inclusiv până la funcția de cercetător principal I angajat nepermanent. Este măsura prin care se asigură continuitatea fluxului și ritmului productivității științifice și disipează starea de spirit a "angajării pe viață".

PARTICIPARE LA ÎNVĂȚĂMANT, EDUCAȚIA ÎN ȘTIINȚĂ ȘI FORMAREA CERCETĂTORILOR

PLAN DE ACȚIUNI (1994-1995)

(a) Ideea de bază este stabilirea unei simbioze multifuncționale cu universitățile. Aceasta ar implica: (i) participarea unor cercetatori la învățământul superior sub forma de profesori asociați, remunerați prin cumul; (ii) efectuarea de către unele cadre didactice a unor norme de cercetare în institutele AR; (iii) organizarea și finanțarea (extramurală) de către AR a unor Grupe de Cercetare pe perioade de timp limitate, implantate în universități; (iv) elaborarea și efectuarea de proiecte de cercetare în comun.
(b) Organizarea de cursuri post-doctorale în domenii de vârf și inter-disciplinare, cu participarea și a unor specialiști din străinătate.
(c) Doctoratul în institutele AR. Instituția noastră trebuie să se implice mai hotărâtor în legiferarea doctoratului în știința care și în prezent nu are încă un cadru legislativ clar, acceptat de toate părțile interesate. Țara noastră este datoare să ofere tinerilor absolvenți cele mai bune condiții existente în prezent pentru desăvârșirea pregătirii lor profesional-științifice, indiferent de apartenența instituțională a locurilor de desfășurare a doctoranturii (universități sau institute de cercetare). În unele domenii, condițiile de mediu științific și dotarea tehnico-materială oferite de unele UC ale AR, sunt mult superioare celor existente în catedrele omoloage. Absolvenții solicită dreptul de a-și efectua doctoratul în astfel de institute: pentru astfel de unități, doctoratul cu frecvență ar fi formula cea mai bună. Întreaga și complexa problemă a organizarii doctoratului, a conducătorilor științifici etc. reclamă o elaborată abordare în cadrul grupului de lucru instituit pentru aceasta acțiune.
(d) Echivalarea funcțiilor, gradelor și nivelurilor de salarizare a cercetătorilor cu cele corespunzătoare din învățământul universitar, necesită inițiativa legislativă adecvată.

COOPERAREA INTERNAȚIONALĂ

SITUAȚIA ACTUALĂ

În general, participarea cercetătorilor români, inclusiv cei din AR la variatele programe de cooperare științifică cu Uniunea Europeană (UE), este încă sub nivelul posibilităților. Diversele materiale publicate asupra cooperării în știință și tehnologie dintre Uniunea Europeană și țările Central și Est-Europene relevă poziția minoră pe

care o ocupă România în cadrul acestor relații. Din datele furnizate de programul PECO 92 se poate constata ca finanțarea prin aceste programe atinge pentru țări ca Ungaria, Cehoslovacia și Polonia valori între 2-3 milioane ECU, în timp ce România nu depășește 0,5 mil. ECU. Numărul de proiecte COST este între 30 și 50 pentru cele trei țări menționate mai sus, România fiind prezentă doar cu 4 (jumătate din numărul de proiecte aprobate Bulgariei sau Sloveniei). În schimb, România are un mare număr de deplasări în vest (361) față de numai 244 ale cercetătorilor maghiari. Acordurile inter-academice sunt absolut necesare și ele trebuie amplificate și diversificate. Dar ca și la cooperarile în cadrul programelor UE, rămâne de gândit problema eficienței acestor participări reflectate final în producția științifică. Înțelegerile de colaborare între persoane s-au dovedit deseori formule mai eficiente decât cele într-un cadru instituțional mai larg organizat.

PLAN DE ACȚIUNI (1994-1995)

(a) Măsuri pentru ameliorarea situațiilor semnalate la "Situația actuală".
(b) Crearea în cadrul Bugetului AR a unui fond special pentru finanțarea colaborărilor internaționale. Un astfel de fond ar urma să fie alocat pe baza competiției și nu acordat automat oricărei cooperări internaționale; multe dintre acestea sunt finanțate de UE.
(c) Crearea în cadrul AR a unui Oficiu pentru Integrare în Programele de Cooperare Europene și Internaționale.
(d) Organizarea în UC ale AR de doctorate și stagii de specializare pentru cercetători străini.
(e) Explorarea posibilităților de creare la Casa Academiei a unui Centru de Congrese.

CADRUL LEGISLATIV

PLAN DE ACȚIUNI (1994-1995)

(a) Participare la elaborarea Legislației privind Cercetarea si Statutul Cercetatorului;
(b) Inițierea Legii pentru restituirea patrimoniului AR;
(c) Cadrul legislativ-normativ pentru constituirea Fondului Român pentru Cercetare;
(d) Elaborarea Regulamentului de Funcționare a unităților de cercetare ale AR;
(e) Îmbunătățirea Statutului Academiei Române și completarea cu un set de Instrucțiuni;
(f) Modificarea instructiunilor AR la Legea Nr. 70/16 iulie 1992 pentru acordarea dreptului unităților de cercetare de a folosi veniturile suplimentare obținute prin contracte, precum și a instrucțiunilor care limitează veniturile din contracte ale cercetătorilor.
Evident, activitatea de cercetare în general va beneficia semnificativ de emiterea

mai rapidă a Legii Fundațiilor, Legii Sponsorizării, Legislația Fundațiilor mixte (ex. Româno-Americane) "Incorporated", normative explicite privind scutirea unităților de cercetare de taxe vamale, TVA, etc.

CALENDARUL ACȚIUNILOR QUO VADIS ACADEMIA?

ORGANIZARE

Colective de lucru: feed-back al secțiilor, filialelor, institutelor și cercetătorilor AR; interacții cu universitățile, academiile de ramură, alte institute; consultări cu comisiile pentru Știință și Învățământ ale Parlamentului.

TERMENE DE REALIZARE

SEMESTRUL II 1994

1. Auditarea unităților de cercetare, a conducerii lor și a cercetătorilor: analiza și propuneri;
2. Ocuparea prin concurs a posturilor de director;
3. Dezvoltarea rețelei de informare + banca de date;
4. Selectarea direcțiilor și domeniilor prioritare;
5. Participarea la înființarea Fondului Român pentru Cercetare;
6. Evaluarea Programelor Sectoriale și Instituționale;
7. Elaborarea unui sistem eficient de raportare a rezultatelor și utilizării fondurilor;
8. Elaborarea Metodologiei Granturilor Competitive și a elaborării prin "peer review" a ofertelor de cercetare;
9. Alcătuirea Bugetului pentru 1995 după sistemul de Finanțare complexă;
10. Măsuri pentru îmbunătățirea veniturilor cercetătorilor;
11. Crearea Oficiului pentru integrare în Programele de Cooperare Europene și internaționale;
12. Inițierea legii pentru restituirea patrimoniului AR.

La aceste acțiuni s-au înscris un număr de 54 membri ai Academiei, directori de institute, cercetători, inserându-și numele pe 91 de poziții de participanți la realizarea celor 12 obiective de mai sus. Acești colegi vor fi curând convocați pentru stabilirea în comun a metodologiilor de lucru, termenelor și coordonatorilor.

Impresionanta amploare a acestui răspuns constituie un revelator indiciu al interesului activ față de mersul mai departe al Academiei Române, o reconfortantă exemplificare a ceea ce spunea Ovidius: "Felix qui, quod amat defendere fortiter audet."

Ulterior, vor fi abordate acțiunile planificate pentru 1995:

SEMESTRUL I 1995

13. Introducerea Granturilor Competitive cu "peer review";
14. Crearea de Grupuri de Cercetare pe perioade limitate în universități și alte institute;

15. Evaluarea ex-post a rezultatelor obținute in 1994;
16. Elaborarea unui program complex de formare a tinerilor cercetători;
17. Intervenții pentru asigurarea cadrului legislativ al echivalării funcțiilor și gradelor, cercetare - învățământ;
18. Explorarea posibilităților de creare la Casa Academiei a unui Centru pentru Congrese;
19. Participarea la elaborarea Statutului Cercetătorului;
20. Modificarea Statutului AR conform cu noile restructurări.

SEMESTRUL II 1995

21. Crearea de burse complexe: specializare în străinătate (1-2 ani), plus dotarea laboratorului;
22. Cursuri post-doctorale.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

World Science Report 1993, Banson Pbl., London 1993.

Projet de loi de finances pour 1994 – Etat de la recherche et du development technologique, Paris, imprimerie Nationale, 1993.

The Max-Planck-Gesellschaft and its institutes – Portrait of a Research Organization, IIIrd edition, Publ.MPG, Munchen, 1993.

Report of the Federal Government on Research 1993. Abridged Version, Federal Ministry for Research and technology, 1993.

Science and Engineering Indicators 1993, National Science Foundation national Science Board, Washington D.C., USA, 1993.

Toward the next century: the state of U.S. science and engineering. National Science Foundation February 1994, Arlington V.A., USA.

Consultation nationale sur les grands objectifs de la recherche francaise – Rapport d'orientation, Imprimerie Nationale, Paris, 1994.

Need for Knowledge and competence in the swedish society at the beginning of the twenty first century. Agenda 2000 – Ministry of Education and Science, Nordstedts Tryckeri AB, Stockholm 1994.

UCSF Science/Health education partnership.A new directions in pre-college science education for NAS. The ASCB Newsletter, 16, No 7, 1993.

Competitiveness for stability. Nature, 364, 571, 1993.

Some lingering controversies confront Bruce Alberts as he succeds Frank press at National Academy helm, The Scientist, 7, No 14, 1, 1993.

Basic research revisited, Nature, 363, 194, 1993.

Bulgarian strike lifts science budget, Nature, 368, 87, 1994.

Slovak science lacks finance, direction… while Czech budget doubles,

Nature, 368, 386, 1994.

Hungary's academy fights to build a new role. Nature, 367, 503, 1994

Philipson, L.Support for the new biology in an integrated Europe. The New Biologist, 2, No 11, 931, 1990

Evaluation of research. A selection of current practices, OCDE Publ. Serv, Paris, 1987.

Latvian research. An international evaluation. The Danish Research Councils, Copenhagen, 1992.

The scientific and technological development system in Hungary, OMIKK, Budapest, 1991.

Russian science gets caught up in struggles over political reform. Nature, 365, 283, 1993.

Can federal agencies preserve science in CIS, Eastern Europe? J.NIH Res, 4, 52, 1992.

Can good science be done in the newly emerging European democracies? The FASEB J., 5, 2125, 1991

After the wall: East-West scientific exchanges escalate. J.NIH Res., 2, 73, 1990.

Funding research. Workbook for governments wishing to establish a granting council (prep. G. Tillman). The World Bank, Washington D.C., 1992

Czechs revise policy on research funding: aim for a more Western approach. Nature, 361, 104, 1993.

Networks of centers of excellence. Competition announcement, Inter – Council program Directorate, Innovaction, Canada, 1992.

Cherfas, J. Peer review: software for hard choices. Science 250, 367, 1990.

M.Khan et.al. The national Institutes of Health is going high-tech in peer review. FASEB J., 6, 2385, 1992.

Gershon, E.S. Gillin, J.C. What the intramural and extramural systems of federally funded biomedical research can learn from each other. J. NIH Res 4, 20, 1992.

Sharp. P. The crisis in funding: a time for decisions. Cell, 62, 839, 1990.

Funding: new ideas for tight money. J. NIH Res. 5, 31, 1993.

Proposal for a Council Decision concerning the fourth framework programme of the EEC activities in the field of research, technological development and demonstration (1994-1998), COM (93) 276 final, Brussels, 1993.

Direcții principale ale reformei activității de cercetare științifică și dezvoltare tehnologică (C and D) în România. Studiu de sinteză redactat de N. Simionescu, Gh. Zaman, A. Toia și S. Sandu, București, 1993.

PRINCIPII GENERALE ALE STRATEGIEI REFORMEI CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE ȘI DEZVOLTĂRII TEHNOLOGICE ÎN ROMÂNIA

PRINCIPII GENERALE ALE STRATEGIEI REFORMEI CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE ȘI DEZVOLTĂRII TEHNOLOGICE ÎN ROMÂNIA

ACAD. NICOLAE SIMIONESCU

PREMIZE ȘI OBIECTIVE

Tranziția României la sistemul democratic al statului de drept și la o economie de piață presupune transformarea activității de cercetare științifică și dezvoltare tehnologică (C&D) într-o componentă primordială, cu statut de invariant, al întregului proces de reformă și de dezvoltare economico-socială și culturală. Implicarea directă a activității C&D în procesul reformei la nivel macro- și microeconomic este o condiție obligatorie, nerespectarea ei având ca efect perpetuarea și adâncirea în ritm accelerat a decalajelor tehnologice și de competitivitate în defavoarea României, cu impact negativ asupra statutului României în evoluțiile care vor avea loc pe plan regional, european și mondial.

Cercetarea științifică și dezvoltarea tehnologică reprezintă o ramură strategică prioritară, întrucât:
(i) participă direct la elaborarea programelor de restructurare a ramurilor, sectoarelor și întreprinderilor din economie; activitatea concretă de retehnologizare și modernizare a economiei nu poate fi realizată fără acordul concret și direct al activității C&D;
(ii) contribuie direct, prin programe de interes național, la îmbunătățirea calității vieții în România;
(iii) conferă identitate patrimoniului intelectual al României în cadrul comunității științifice internaționale;
(iv) asigură creșterea performanțelor și competitivității unor întreprinderi, tehnologii și produse românești, în vederea pătrunderii și consolidării acestora pe piața națională și internațională;
(v) sprijină procesul de creare, menținere și dezvoltare pe baze competitive, la nivel tehnologic ridicat, a întreprinderilor mici și mijlocii, orientate spre producție; contribuie la creșterea nivelului general de cunoștințe, la schimbarea mentalităților și fundamentarea deciziei la diferite niveluri.

Realizarea rolului de factor motor pe care îl are activitatea de C&D în economie, implică emiterea unor decizii de principiu însoțite de măsuri concrete corespunzătoare:
(i) Decizia politică explicită, la nivelul Guvernului și a altor factori responsabili, privind cunoașterea și atribuirea rolului vital pe care îl are activitatea C&D ca problemă de stat de interes național. Sub un anumit nivel de implicare directă a Statului în

elaborarea, coordonarea și realizarea unor Programe de cercetare-dezvoltare de interes național, precum și în asigurarea unui anumit nivel de finanțare din fonduri publice a activității C&D, nu se poate vorbi de o politică guvernamentală reală în domeniul științei și tehnologiei.
(ii) Decizia economică care să asigure finanțarea adecvată a diverselor tipuri de activitate de C&D (cercetare fundamentală, direcțională, aplicativă) într-un cadru instituțional diferențiat, realizată printr-un sistem de finanțare care va trebui să asigure: creșterea și consolidarea surselor publice de finanțare a C&D; diminuarea decalajelor existente și participarea efectivă a României în competiția științifică, tehnologică și economică pe plan mondial; dezvoltarea depinde direct de creșterea treptată, semnificativă, a volumului real al fondurilor de C&D; pluralismul și diversificarea surselor și mecanismelor de finanțare directă și indirectă a C&D; stimularea cererii de C&D; susținerea ciclului cercetare științifică-dezvoltare tehnologică în ansamblul său, până la aplicare; participarea întreprinderilor la finanțarea proiectelor de C&D.
(iii) Deciziile manageriale, la nivelul MCT, ale Academiei Române, ale ministerelor și departamentelor, ale institutelor de cercetare-dezvoltare și ale agenților economici, de realizare a reformei pe plan sectorial și instituțional privind structurile și mecanismele de elaborare, finanțare, coordonare și realizare a programelor și proiectelor de cercetare; restructurările vor asigura și măsurile necesare de protecție socială.

Implicarea activă și constantă a comunității științifice în elaborarea și coordonarea strategiei naționale, sectoriale și instituționale. Includerea în organele de coordonare pe baze riguros științific-profesionale a specialiștilor cu recunoscută expertiză în managementul și efectuarea cercetării științifice; perfecționarea sistemului de promovare a valorilor intelectuale.

Modelul spre care se tinde prin Reforma C&D în România trebuie să se bazeze, cu suplețea necesară, pe acele experiențe pozitive din alte țări care au elemente comune compatibile cu tradiția, realitățile și obiectivele reformei economico-sociale și cultural-științifice din țara noastră.

Obiectivul global al Refomei C&D este sporirea eficienței economico-sociale și creșterea contribuției românești la dezvoltarea științei și culturii românești și mondiale.

ORIENTĂRI ALE REFORMEI C&D ÎN ROMÂNIA

GENERAL

(1) Datorită complexității, profunzimii și multiplelor sale implicații, se anticipează că reforma C&D va fi un proces relativ lent, treptat, desfășurat pe mai multe orizonturi de timp și obiective sinergice cu etapele tranziției la sistemul democratic al statului

de drept și la economia de piață în România.
(2) Măsurile de reformă trebuiesc bazate pe principiul păstrării, dezvoltării și perfecționării componentelor valoroase din C&D românească, și a completării lor cu noi structuri și mecanisme care să corespundă cerințelor și standardelor actuale ale științei și tehnologiilor performante.

MANAGEMENTUL

(1) Descentralizarea instituțională și funcțională la nivelul necesar pentru asigurarea autonomiei și flexibilității unităților și echipelor de C&D care să permită alegerea celor mai adecvate forme de organizare, programare și realizare a activității de C&D. Descentralizarea procesului decizional și sporirea autonomiei funcționale trebuie obligatoriu dublate de responsabilitatea corespunză-toare față de acțiunile asumate de diverși factori implicați în selectarea programelor, folosirea resurselor financiare și raportarea periodică a rezultatelor obținute. Autonomia și libertatea academică, în sensul lor cel mai larg, funcționează în condițiile creării unui sistem instituțional coerent, capabil să asigure coordonarea și realizarea finanțării și evaluării rezultatelor C&D în concordanță cu obiectivele strategice și prioritățile Programelor de cercetare de interes național, sectorial, instituțional. Acest sistem trebuie să aibă un înalt prestigiu în fața comunității științifice.
(2) Reducerea substanțială a birocrației în diversele etape ale procesului de C&D.
(3) Evaluarea în condiții de perfectă responsabilitate și imparțialitate deopotrivă a programelor de cercetare propuse "top-down" cât și a celor "bottom-up", sugerate de cercetători sau grupuri.
(4) Raportul sector public-sector privat al sistemului C&D trebuie stabilit pe baza principiilor competiției și cooperării specifice pieței științei și nu prin măsuri administrative.
(5) Utilizarea de către consiliile în acest scop stabilite la nivelul Academiei Române, Ministerului Cercetării și Tehnologiei, Ministerului Învățământului, Fondului Român pentru Știință, a procedurilor de evaluare ex-ante, interimar și ex-post și a principiului competitivității, în finanțarea programelor și proiectelor de cercetare propuse de diverse instituții sau persoane.
(6) Stimularea și sprijinirea concretă a cooperării și interacției componentelor sistemului C&D.
(7) Stimularea transferului tehnologic și difuzarea cunoștințelor noi la nivel sectorial, interregional și internațional.
(8) Multiplicarea, diversificarea și flexibilitatea formelor de organizare, funcționare și finanțare ale sistemului C&D în vederea unei mai bune concordanțe dintre cererea și oferta de C&D, și a intensificării legăturilor dintre cercetarea academică, universitară, tehnologică și industrie.

STRUCTURA INSTITUȚIONALĂ

(1) Activitățile de C&D se desfășoară în principal în trei sisteme instituționale: Academia Română, Ministerul Cercetării și Tehnologiei (MCT) și Ministerul Învățământului, care au autonomie în elaborarea, coordonarea și finanțarea propriilor programe și proiecte de cercetare. Fiecare din cele trei sisteme are un organism propriu de coordonare a C&D: Academia Română = Prezidiul și Secțiile de Specialitate însumând 177 de specialiști, membrii ai Academiei Române; MCT = Colegiul Național Consultativ pentru Cercetare și Dezvoltare; Ministerul Învățământului = Consiliul Cercetării Universitare.
(2) Institutele Academiei Române desfășoară activități predominant în domeniul cercetărilor fundamentale și direcționale, institutele MCT îndeosebi în aria cercetărilor aplicative și de dezvoltare tehnologică, iar Ministerul Învățământului în variate domenii fundamentale, aplicative și interdisciplinare.
(3) Concomitent, cele 3 principale sisteme de C&D colaborează în definirea strategiei C&D pe plan național, formularea Programelor Naționale, formarea cercetătorilor, contribuind conform cu specificul, expertiza și rolul lor, la elaborarea și realizarea politicii de stat în domeniul C&D.
(4) Pentru creșterea performanțelor activităților de C&D și a eficienței investițiilor publice în acestea, este absolut necesară auditarea și evaluarea periodică a unităților de cercetare, proiectelor, conducerii institutelor și cercetătorilor.
(5) Pentru ameliorarea sau eliminarea unor disfuncții ale actualului sistem instituțional al C&D, este necesară crearea de noi instituții și organisme de interes național sau sectorial (ex. Fondul Român pentru Știință, Agenția Națională de Transfer Tehnologic ș.a.). Academia Română propune înființarea Comitetului Consultativ pentru Cercetare și Dezvoltare, organism format din specialiști de înaltă valoare în domeniul managementului în cercetare și în cercetarea propriu-zisă. Acest comitet interdepartamental propus și în materialul final al Proiectului Băncii Mondiale (ianuarie 1994) ar avea drept scop elaborarea materialelor pe baza cărora Consiliul Interministerial pentru Știință și Tehnologie să formuleze propunerile înaintate Guvernului.
(6) Sprijin financiar și asistență pentru dezvoltarea în continuare a "centrelor de excelență" din România care sunt recunoscute ca atare pe plan internațional și crearea unor noi astfel de unități de cercetare în care țara noastră are evidente avantaje comparative și perspective.

FINANȚAREA

Finanțarea activității C&D trebuie să se bazeze pe:

(1) creșterea substanțială a fondurilor alocate de la bugetul de stat;
(2) cofinanțarea de către industrie și agenții comerciali interesați, îndeosebi a

cercetărilor aplicative și de dezvoltare tehnologică;
(3) aplicarea sistemelor competitive, de tip "grant";
(4) stimularea asigurării și prin finanțarea indirectă a finanțării C&D, astfel încât ponderea fondurilor private să crească pe măsura consolidării mecanismelor de piață;
(5) obținerea de asistență financiară internațională prin cooperare științifică în proiecte și programe comune.

RESURSELE UMANE

În această componentă cheie a C&D, reforma prevede:

(1) Îmbunătățirea substanțială a salariilor și altor venituri ale cercetătorilor, cu posibil efect pozitiv și asupra emigrării oamenilor de valoare.
(2) Elaborarea unor politici de încadrare, formare/perfecționare, selecție, evaluare a cadrelor și a managerilor de C&D, care să urmărească asigurarea funcționării unităților C&D cu un potențial uman de înaltă pregătire profesională, respectiv managerială, în scopul promovării competenței și excelenței.
(3) Elaborarea unei politici în domeniul mobilității personalului, asociată cu o politică de protecție socială, în vederea asigurării reorientării personalului C&D în corelare cu necesitățile economiei naționale, cu calificarea și opțiunile oamenilor.
(4) Încadrarea prin concurs a directorilor unităților de cercetare și reevaluarea lor la 4 ani.
(5) Bursele de specializare în străinătate a tinerilor cercetători să fie sistematic dublate de investițiile financiare adecvate pentru asigurarea la nivelul standardelor naționale a condițiilor tehnice de lucru la unitatea de cercetare unde urmează să revină.

REFORMA ÎN DOMENIUL COOPERĂRII ȘTIINȚIFICE ȘI TEHNICE INTERNAȚIONALE

Aceasta urmărește elaborarea și aplicarea unei strategii concretizate într-un program de acțiuni orientat activ spre intensificarea cooperării științifice internaționale și integrarea în programele europene de C&D.

REFORMA SISTEMULUI LEGISLATIV C&D

Aceasta are ca obiective principale:

(1) perfecționarea cadrului legislativ existent, prin introducerea de noi acte normative, reglementări, metodologii necesare aplicării și susținerii măsurilor de reformă în domeniul instituțional C&D, al managementului C&D, al sistemului financiar C&D, al resurselor umane, al cooperării științifice și tehnice internaționale etc.;

2) armonizarea legislației românești în domeniul C&D cu cea aplicată în țările dezvoltate.

INVARIANȚII REFORMEI C&D ÎN ROMÂNIA

Principalele obiective strategice de ridicare a competitivității economiei naționale și dezvoltarea culturii, urmărite prin reforma activității de cercetare științifică și dezvoltare tehnologică sunt:

(1) pe termen scurt: consolidarea legăturilor cercetare - dezvoltare - societate în general, și în mod special cercetare - dezvoltare - economie, în scopul accelerării procesului de restructurare în economie și a relansării producției și serviciilor, cât și al îmbogățirii continue a contribuțiilor românești la știința și cultura universală;
(2) pe termen mediu: integrarea efectivă a României în fluxurile tehnologice internaționale, în scopul modernizării economiei prin asimilarea unor tehnologii avansate și a sistemelor performante de asigurare a calității;
(3) pe termen lung: obținerea unor rezultate C&D competitive pe plan mondial și atingerea stadiului de independență tehnologică în unele domenii de vârf.

Concretizarea acestor obiective se realizează prin ansamblul măsurilor de reformă orientate spre perfecționarea componentelor sistemului și activității C&D, măsuri care sunt redate mai în amănunt în materialul însoțitor acestei note de prezentare a principiilor generale propuse a sta la baza reformei C&D în România.

FINANȚAREA COMPETITIVĂ A CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE FUNDAMENTALE ȘI DIRECȚIONATE PRIN GRANTURILE ACADEMIEI ROMÂNE

Pentru a-și îndeplini rolul său de instituție științifică și culturală de vocație națională, Academia Română a inițiat un plan de măsuri menite să stimuleze cercetarea științifică de performanțe deosebite și să promoveze excelența în știință. În cadrul acestor măsuri, Academia Română va institui începând cu anul 1995 o finanțare competitivă a cercetării științifice prin Granturile Academiei Române (GAR).

Sistemul GAR introduce principiile stimulative ale liberei competiții în știință care a constituit și reprezintă și în prezent una dintre cheile remarcabilelor progrese științifice și tehnologice obținute în țările avansate; el va funcționa concomitent cu finanțarea pe programe și proiecte în cadrul instituțional actual al Academiei Române. În vederea aplicării încă din 1995 a acestui sistem de finanțare a fost constituit Consiliul Granturilor Academiei și a fost aprobat Regulamentul de acordare a acestor granturi care asigură mecanismele adecvate pentru selectarea celor mai valoroase proiecte de cercetare, apte să conducă la rezultate competitive pe plan mondial, cu important

impact în dezvoltarea economico-socială a ştiinţei şi culturii în ţara noastră.

Sistemul de finanţare prin GAR are următoarele caracteristici:

(a) Sistemul este accesibil tuturor persoanelor fizice şi juridice din ţară independent de apartenenţa lor administrativă (universităţi, academii, ministere ş.a.)
(b) Procedura de evaluare a cererilor de grant se desfăşoară într-o deplină transparenţă
(c) Temele de cercetare propuse pentru finanţare prin GAR pot fi iniţiate prin cele două mecanisme larg folosite în ţările avansate: (i) teme propuse de către persoane fizice sau juridice; (ii) proiecte sau programe de interes naţional formulate de către Academia Română în domenii pe care aceasta le consideră prioritare şi pentru a căror rezolvare invită cercetători şi colective să supună spre selecţie teme adecvate.
(d) Sistemul GAR finanţează de asemenea şi o serie de acţiuni ajutătoare proiectelor de cercetare: calificarea tinerilor cercetători, organizarea de infrastructuri de înaltă tehnologie, reţele de informatică, colaborări internaţionale etc.
(e) Propunerile de teme de cercetare şi activităţi corelate vor fi examinate şi selecţionate de Comisii de Evaluare alcătuite din specialişti recunoscuţi din ţară şi străinătate, avându-se în vedere ca principale criterii de selecţie meritul ştiinţific, originalitatea şi contribuţia la progresul ştiinţei şi la soluţionarea unor probleme ale vieţii sociale şi economice în general şi ale ale României în special.
(f) Continuarea de la un an la altul a finanţării este riguros condiţionată de rezultatele obţinute evaluate periodic de comisiile de specialişti ai GAR.

Funcţionarea sistemului granturilor Academiei Române este condiţionată de constituirea unui fond distinct şi suplimentar la bugetul de venituri şi cheltuieli al Academiei Române, provenit din diferite surse, atât bugetare, cât şi extrabugetare (donaţii, sponsorizări etc.).Potrivit estimărilor, fondul necesar desfăşurării etapei iniţiale a finanţării competitive prin acordare de granturi se ridică la 7.000 mil. lei, în care partea cea mai importantă (circa 90%) se solicită de la Bugetul de Stat pe anul 1995. Faţă de cele de mai sus, pentru susţinerea activităţii de cercetare ştiinţifică prin granturi, este necesar ca în proiectul legii pentru aprobarea Bugetului de Stat pe anul 1995 să fie prevăzută suma de 7.000 mil. lei în mod distinct pentru Academia Română, pe lângă sumele prevăzute pentru finanţarea Academiei Române şi a institutelor sale.

PROGRAME DE INTERES NAŢIONAL ALE ACADEMIEI ROMÂNE:

MOTIVAŢIILE TINERETULUI ROMÂN ÎN PERIOADA ACTUALĂ

Proiectul urmează să identifice problemele actuale ale tineretului român şi, totodată, să analizeze măsura în care societatea poate răspunde cerinţelor tineretului şi modalităţile în care urmează a se concretiza acest răspuns.

ROMÂNIA 2020
Pornind de la progresele științei și tehnologiei, proiectul urmărește a le folosi în soluționarea problemelor economice și sociale cu care se confruntă societatea românească.

DICȚIONARUL TEZAUR AL LIMBII ROMÂNE
Prin proiect se urmărește ca această acțiune de tezaurizare și evidență a limbii române să fie încheiată până în anul 2000 și va cuprinde 37 volume, din care 27 sunt tipărite.

DICȚIONARUL GENERAL AL LITERATURII ROMÂNE
În acest dicționar, indispensabil oricărei culturi, va fi cuprinsă întreaga literatură română, de la începuturi până la anul 1995, inclusiv scriitorii din ținuturi românești din afara granițelor și din diaspora, el urmând a fi realizat în 4-5 volume.

ISTORIA ROMÂNILOR
Proiectul are în vedere realizarea în zece volume a istoriei românilor, care va înfățișa nivelul actual al istoriografiei naționale, corelat problematicii mondiale și care răspunde unor necesități stringente de cunoaștere de sine ale societății românești.

CONTRIBUȚIA ACADEMIEI ROMÂNE LA PROTEJAREA INTEGRITĂȚII MEDIULUI "ZIUA MONDIALĂ A MEDIULUI" - BUCUREȘTI, 5 IUNIE 1994

În decursul existenței sale Academia Română s-a implicat în numeroase aspecte conceptuale sau concrete ale protecției mediului înconjurător. Să amintim doar opera lui Grigore Antipa, fondatorul Școlii românești de ecologie și remarcabila sa contribuție la gospodărirea rațională a Deltei și zonei inundabile a Dunării. De asemenea, aportul lui Emil Racoviță la fundamentarea principiilor și normelor ce stau la baza ocrotirii naturii. Străduințele sale, alături de cele ale eminentului om de știință Alexandru Borza, au dus la promulgarea primei legi de ocrotirea naturii și înființarea în 1930 a "Comisiunea pentru Ocrotirea Monumentelor Naturii". Pe baza unor temeinice cercetări științifice, activitatea acestei comisii a condus la statuarea primelor rezervații naturale (1932) și a primului parc național, cel din Munții Retezat (1935). După anul 1954, de când această comisie funcționează sub auspiciile Academiei, numărul rezervațiilor naturale a crescut de la 37 la peste 620, conservând eșantioane reprezentative ale ecosistemelor naturale, martori din evoluția scoarței terestre, fenomene naturale sau situri cu impotanță științifică deosebită.

Institutul de Biologie al Academiei, în colaborare cu Institutul de Geografie și cu alte institute au finalizat recent studiul "Diferențierea ecoregiunilor de pe teritoriul

României", în vederea evaluării stării acestora și Studii privind dezvoltarea rețelei de parcuri naționale. Prin finanțarea de către Comunitatea Europeană, un colectiv coordonat de Academia Română prin Institutul de Biologie-București abordează în prezent extinderea și completarea proiectului CORINE (Coordination of information on the environment) privind Biotipii în România. Tot în acest an debutează importante programe privind:
(a) cercetări vizând cunoașterea biodiversității în profil teritorial și dezvoltarea rețelei ariilor protejate;
(b) cercetări taxonomice privind fauna României și conexiunile ei pe plan euroasiatic și mondial;
(c) colaborare la programul "Identificarea mecanismelor productivității și evaluarea capacității productive a ecosistemelor din zona inundabilă a Dunării și Delta Dunării", coordonat de Facultatea de Biologie a Universității București.

În anul în curs, Institutul de Geografie al Academiei își concentrează activitatea pe numeroase programe legate de protecția mediului, dintre care menționăm: (i) Schimbări ale structurilor fizice și economico-geografice din Valea Dunării românesti; (ii) Studiul condițiilor geografice actuale din Delta Dunării și de pe litoralul românesc al Mării Negre în scopul protecției ecosistemelor naturale și a unei dezvoltări durabile; (iii) Cauzele și consecințele hazardelor naturale; (iv) Atlasul geografic al mediului.

În timp ce aceste activități de protecția mediului continuă în diverse structuri organizatorice din țara noastră, pe Plan Internațional, s-au impus puternic trei idei:
(1) Deteriorarea mediului și capitalului natural la scară regională și globală au atins asemenea dimensiuni încât plasează dezvoltarea economico-socială din următoarele decenii într-o zonă extrem de critică;
(2) Stoparea deteriorării mediului și recuperarea capitalului natural, asociate cu un riguros control demografic, sunt elemente cheie în dezvoltarea mai departe a societății umane;
(3) Realizarea deziderateloe enunțate mai sus este strict condiționată de elaborarea unei strategii și înființarea unor structuri operaționale complexe naționale, regionale și internaționale.

În lumina acestor noi concepte, Academia Română a înțeles necesitatea de a-și depăși limitele sferei sale tradiționale de activitate și a contribui direct la asigurarea transferului unor rezultate științifice în planurile de acțiune emanate din strategiile enumerate anterior.
Astfel, COMISIA DE ECOLOGIE A ACADEMIEI ROMÂNE a acționat în sensul: (i) promovării și susținerii proiectelor care au vizat evaluarea stării structurii ecologice (ecoregiuni) la nivel național; (ii) evaluării informației existente privind diversitatea specifică/taxonomică; (iii) constituirii rețelei naționale de colective/centre care au expertiză și pot asigura derularea proiectelor de cercetare care se dezvoltă (proces

dificil și lent); (iv) integrării în rețele de cercetare regională (ERMAS, DIVERSITAS, CORINE etc.).

Comisia de ecologie își propune ca obiective de prezent și perspectivă imediată a următoarelor priorități: Dezvoltarea și promovarea proiectelor de cercetare a capacității productive și de suport a categoriilor de sisteme ecologice de pe teritoriul țării; Facilitarea integrării în rețele internaționale de cercetare; Implicarea comunității academice în procesul de elaborare a strategiei naționale de "conservare a biodiversității" și de susținere științifică a acțiunilor la nivel național și european de conservare a biodiversitații și de menținere a integrității capitalului natural.

În același timp, un alt organism creat de Academia Română în anul 1991, Comitetul Național Român pentru Programul Internațional "Geosferă-Biosferă" își concentrează activitatea pe descrierea și interpretarea interacțiunii proceselor fizice, chimice și biologice care reglează Sistemul Terestru Global, precum și implicarea specialiștilor români în Programul internațional ENRICH (European Network for Research in Global Change).

Prin aceste acțiuni și prin altele ce vor urma, Academia Română înțelege să se alăture din ce în ce mai mult efortului cercetării științifice menită să sporească continuu baza de cunoaștere absolut necesară adoptării unor decizii corecte și eficiente pe termen lung, prin care România să-și aducă o semnificativă contribuție la entropia reciprocă a interacției omului cu mediul natural căruia îi aparține.

QUO VADIS, ACADEMIA?
FINANȚAREA COMPETITIVĂ A CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE PRIN GRANTURILE ACADEMIEI ROMÂNE

QUO VADIS, ACADEMIA ?
FINANȚAREA COMPETITIVĂ A CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE PRIN GRANTURILE ACADEMIEI ROMÂNE

PUBLICAT ÎN ACADEMICA NR. 2, 1994

CUVÂNT INAINTE

Cu intenția de a stimula și orienta pe orbitele științei contemporane cercetarea științifică din Academia Română, a fost elaborat un plan pe măsuri care a fost aprobat de Adunarea Generală a Academiei Române din 11 mai 1994. O sinteză a acestor măsuri a fost publicată în "Academica" IV/8(44), iunie 1994, pg.15-18. Reacția imediată a membrilor Academiei a fost remarcabilă: peste 50 de colegi s-au oferit să participe la cele 13 acțiuni preconizate pentru care au fost înregistrate peste 90 de înscrieri. Conform calendarului stabilit pentru anul în curs, 7 dintre aceste acțiuni au început a fi elaborate de colective formate atat din membri ai Academiei, cât și de cercetători și conducători ai unor institute de cercetare. Dintre aceste acțiuni, cea care a ajuns la un avansat stadiu de concretizare este introducerea unui sistem de "Finanțare Competitivă a Cercetării Științifice prin Granturile Academiei Române". Aceasta acțiune, prezentată și aprobată de Adunarea Generală a Academiei la 8 noiembrie 1994, a făcut obiectul Deciziei nr.852 din 26.XI.1994 a conducerii instituției noastre. Prin ea se validează de asemeni componența Consiliului pentru Granturile Academiei Române și Regulamentul de organizare și funcționare a acestui nou sistem de finanțare a cercetării. Aceste materiale sunt redate mai jos. Cu prilejul publicării lor, deschidem o nouă rubrică în "Academica", purtând motto-ul articolului inițial asupra reformei cercetării în Academie "Quo vadis, Academia?". În cadrul acestei rubrici, pe de o parte vom informa cititorii asupra progreselor realizate și a problemelor întâmpinate în diversele acțiuni de restructurare a cercetării științifice în rețeaua noastră instituțională, iar, pe de altă parte invităm pe toți cei interesați să-și exprime puncte de vedere și propuneri constructive menite să asigure realizarea în cei mai adecvați parametri a acestor acțiuni.

FINANȚAREA COMPETITIVĂ A CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE PRIN GRANTURILE ACADEMIEI ROMÂNE

Acad. Nicolae Simionescu, Vicepreședinte al Academiei Române,
Dr. Gheorghe Zaman, Directorul Institutului Național de Economie
Dr. Steliana Sandu, cercetător științific principal la Institutul Național de Economie
Stelian Beldescu, Secretar Științific

Un aparent paradox al lumii contemporane ar opune impresionantele succese ale științei unei relative dar general resimțite limitări ale resurselor financiare alocate cercetării științifice și dezvoltării tehnologice. Această disjuncție a atins dimensiuni îngrijorătoare îndeosebi în domeniul științelor fundamentale, afectate în acest sens chiar și în unele țări dezvoltate. Astfel de aprecieri apar elocvent în majoritatea literaturii recente de politica științei inclusiv în documente oficiale de analiză cum este recentul studiu "Știința în interesul național" emis de Oficiul Casei Albe pentru Politica Științei și Tehnologiei (OSTP).

Deși este recunoscută capacitatea cercetării de a oferi o frontieră nesfârșită, știința în sine este apreciată drept o "nelimitată resursă pentru resursele limitate". Factorii care au generat disjuncția amintită sunt extrem de complecși. Printre aceștia: distanța pe de o parte între numărul crescând de tineri scientiști de excelentă calificare, diversitatea și sofisticarea tehnologiilor de lucru și pe de altă parte fondurile pe care statul le poate aloca științei în condițiile în care alte priorități de natură socială, militară, sănătate publică etc. se impun guvernelor. În această conjunctură, competiția între cercetători pentru fonduri a devenit o formulă necesară, deși larg discomfortantă pentru cei care, în loc să se dedice complet minunatei aventuri pentru cunoaștere, trebuie să-și investească 60-70% din timp scrierii de cereri de granturi. Statisticile arată că în țările dezvoltate, deși fondurile alocate cercetării marchează anual o creștere semnificativă, aceasta este practic anulată de fenomenul inflaționist.

Și totuși, în pofida acestor dificultăți a unei ere "de tranziție" marcată de consistența unei științe de succes cu scientiști nemulțumiți și neliniștiți, progresele în cercetare, tehnologie și dezvoltare continuă să schimbe radical existența umană. Pe fondul disputat al necesarului incomplet satisfăcut al costurilor pentru cercetare, alocarea limitatelor resurse bugetare disponibile continuă - în marea majoritate a țărilor - să se efectueze prin sistemul granturilor competitive atât pentru cercetarea propriu-zisă cât și pentru accesul la formarea ca specialist în știință. Deși criticată de unii, finanțarea prin competiție este în continuare considerată o formulă, deși nu ideală, totuși cea mai rezonabilă. Într-un fel sentimentul este comparabil cu cel asupra democrației pe care Winston Churchill în maniera sa inegalabilă o definea drept "regimul cel mai puțin bun din câte pot exista, cu excepția tuturor celorlalte".

Măsurile de ameliorare a crizei finanțării științei (în special a celei fundamentale) și tehnologiei variază de la o țară la alta în funcție de un complex de parametrii printre care: nivelul producției economice, gradul de dezvoltare a sectorului particular, nivelul educației generale în știință, capacitatea locală de a produce sau asimila tehnologia înaltă, prioritățile naționale etc. În ceea ce privește sursele și mecanismele de finanțare, în țările din Europa Centrală (în aceasta includem și arbitrara subdiviziune a "Europei de Est") sistemul bugetelor globale alocate institutelor de cercetare este progresiv asociat cu finanțarea prin competiție a proiectelor individuale sau de grup.

Temele sunt generate printr-unul din cunoscutele formule: "bottom-up" (subiecte propuse de indivizi) și "top-down" (programe elaborate de consilii de experți pentru rezolvarea cărora sunt invitați cercetători din indiferent ce apartenență administrativă). Ambele sisteme sunt larg accesibile, fondurile se alocă exclusiv prin competiție între propuneri evaluate "ex-ante" și apoi și "ex-post" de către comisii de specialiști într-o procedură de totală transparență. Asemenea țărilor avansate, care folosesc granturile competitive de câteva decenii, majoritatea țărilor din jurul nostru aplică deja de un număr de ani acest sistem.

În România, finanțarea cercetării științifice pe bază competitivă este o idee relativ recentă care a fost experimentată doar în câteva domenii ca biotehnologia (inițiată de Comitetul Național pentru Biotehnologie Avansată al Academiei Române și Ministerul Cercetării și Tehnologiei) și informatica. Judecat prin numărul mare al cererilor de grant primite și prin exigența și probitatea comisiilor de evaluare, cele două acțiuni au consituit un succes. În cazul biotehnologiei însă, rezultatul practic a fost în unele cazuri neadecvat datorită scurtcircuitării unor decizii ale comisiilor de specialiști. De remarcat atitudinea emancipată a Curții de Conturi care a cerut ca finanțarea proiectelor să se facă numai după prealabila lor evaluare de către comisii de specialiști în domeniul respectiv. Până acum în țara noastră finanțarea cercetării științifice s-a făcut predominant prin diverse variante de buget global dat unor instituții și prin contracte acordate unor colective de cercetători. Aceste mecanisme, probabil inerente unei etape de tranziție, au fost deseori grevate de inconstanța unor evaluări ex-ante sistematice a proiectelor propuse, cât și a examinării riguroase ex-post a rezultatelor care să condiționeze continuarea finanțării. Ca urmare a acestor imperfecțiuni, unii cercetători performanți nu au avut acces la finanțarea contractelor, în timp ce unele fonduri au ajuns la persoane de contestată valoare profesională.

Ca un rezultat inerent al unor astfel de situații, credibilitatea sistemului în fața comunității științifice poate fi reinstaurată numai prin introducerea unui mecanism responsabil și imparțial prin care și așa puținele fonduri acordate cercetării să fie alocate prin competiție transparentă sub evaluarea specialiștilor de valoare pe care îi are țara noastră. Fără un astfel de sistem competitiv, tinerii care vor să facă o carieră în știință vor fi confuzionați și dezamăgiți și vor continua să-și caute loc de împlinire pe alte meleaguri. În plus, finanțarea prin competiție a unor indivizi sau colective cu dovedite capabilități performante are avantajele majore de a fi sigur mai eficientă decât finanțarea în bloc și de a reprezenta cea mai concretă cale de evaluare și acreditare a unităților de cercetare.

Ca un lucru îmbucurător, în prezent, fiecare din cele trei mari instituții centrale: Academia Română, Ministerul Învățământului și Ministerul Cercetării și Tehnologiei, își organizează un sistem propriu de finanțare competitivă, virtual deschis și celorlalte rețele de cercetare. Aceste sisteme reflectă unele principii generale comune

nuanțate de o serie de particularități. Prin coexistența și interpenetrabilitatea celor trei sisteme se asigură mult necesarul pluralism al surselor de finanțare. Rămâne de realizat o unificare a criteriilor de evaluare folosite în scopul de a asigura ca pe plan național, fondurile să ajungă la cei mai bine pregătiți și mai performanți cercetători.

Aplicarea practică a acestor sisteme de finanțare competitivă este evident condiționată de înțelegerea și sprijinul concret așteptat din partea Guvernului României și, îndeosebi, a Ministerului de Finanțe. În campania de lămurire a autorităților asupra rolului jucat de fiecare tip de cercetare în progresul economico-social al țării și asupra necesității finanțării diferențiate, prin competiție, este hotărâtor ca cele trei instituții centrale: Academia Română, Ministerul Învățământului și Ministerul Cercetării și Tehnologiei să conlucreze în interesul național. Comunitatea noastră științifică dorește și poate fi un substanțial factor în redresarea economică a țării. Oamenii de știință înțeleg că până la redresarea adecvată a producției economice autohtone, fondurile pe care statul le poate acorda cercetării sunt limitate. Dar chiar și în această situație este datoria autorităților de stat ca împreună cu comunitatea științifică să creeze sisteme manageriale prin care minților creatoare să li se ofere infrastructurile și condițiile materiale necesare pentru a produce știință de valoare. O cercetare științifică perfomantă stă, deopotrivă, la baza a culturii naționale, a progresului economico-social, a asigurării mediului intelectual și tehnologic în care tinerii să se poată împlini, a prestigiului internațional. Treptat trebuie redusă până la anulare distanța care astăzi separa quantumul de fonduri alocate științei de numărul și calitatea cercetătorilor din țara noastă. Introducerea și în România a unor sisteme de finanțare pe bază de competiție are și avantajul obișnuirii cercetătorilor noștri cu standardele și condițiile participării la lupta pentru fonduri din străinătate unde, ca și în alte sectoare ale economiei de piață, competiția a devenit o dimensiune majoră a producției științifice. Sistemul de granturi competitive al Academiei Române este destinat îndeosebi stimulării cercetărilor din domeniile științelor fundamentale și direcționate.

COMENTARII GENERALE ASUPRA FINANȚĂRII COMPETITIVE A CERCETĂRII

1. SISTEMUL GRANTURILOR

Toți cei direct sau indirect implicați în știință sunt de acord că este important să investești în cercetare științifică și în scientiști. Este, de asemenea, recunoscută valoarea deosebită a interdependenței dintre cercetarea fundamentală, cea direcțională și cea aplicativă, a conlucrării comunității științifice cu guvernul, industria și celelalte activități ale societății pe plan național și internațional. Pe un plan deasemeni teoretic, fiecare guvern asimilează relativ facil dezideratul major al pregătirii adecvate a cercetătorilor și al educării în știință a populației, a contribuabililor din impozitarea cărora rezultă o

mare parte din bugetul alocat științei și tehnologiei.
Dar, pentru satisfacerea acestor obiective, banii publici disponibili sunt insuficienți. lar atunci când cei ce pledează pentru prioritatea unui anumit gen de cercetare luptă între ei în loc să conlucreze, efectul final este contraproductiv. Astfel de scenarii deosebit de complexe și complicate lasă și în prezent neidentificată -care este- masa critică a surselor financiare, numărul de scientiști, al facilităților tehnice care ar putea asigura vitalitatea cercetării științifice, tehnologice și de dezvoltare capabilă să îmbogățească calitatea vieții populației dintr-o anumită țară. De aceea, în raport cu gradul său de dezvoltare economico-socială, fiecare țară a adaptat și modulează în continuare sistemele de finanțare a cercetării pe care experiența le-a validat ca cele mai eficiente.

Dintre acestea, cel mai extensiv folosit este cel al granturilor competitive. Acest sistem este puternic dedicat cercetării inițiate de scientiști, oferta de proiect fiind evaluată după meritele științifice, fezabilitate și cost de către comisii de specialiști în domeniu. De-a lungul anilor granturile competitive și-au dovedit eficiența în a promova excelențele, de a aduce oameni noi și idei noi în cercetare, de a stopa impostura și a marginaliza sau elimina non-valoarea; chiar doar din enumerarea acestor avantaje, sepoate deduce cat de mare nevoie are cercetarea romanească de un astfel de sistem. Prin participarea la finanțarea cercetării fundamentale și a pregătirii cercetătorilor a tuturor ministerelor și agențiilor care depind hotărâtor de progresele științei și tehnologiei, in tarile dezvoltate s-a asigurat atât de vitalul necesar pluralism al surselor de finanțare. Acestora li s-a adăugat extinderea (pronunțarea) și diversificarea continuă a cooperărilor internaționale ce promovează fluxul continuu de oameni, idei și date. Legarea tot mai pronunțată a cercetarii academice de progresele tehnologice și de industrie, a convertit știința și dezvoltarea dintr-o aparentă linie de producție într-un veritabil ecosistem al cărui rol este asigurarea și preservarea sănătății, prosperității, securității și calității vieții și a mediului înconjurător pentru toți cetățenii.

La toate acestea, un rol hotărâtor l-au jucat granturile competitive, competiția în sine bazata pe recunoasterea si protejarea valorilor autentice in stiinta. Din analiza modului de alocare a granturilor competitive în diverse țări, reiese că sistemul are un anumit grad de heterogeneitate și că în ansamblul lui nu este lipsit de unele critici. Despre acestea intr-un articol viitor vom putea da mai multe detalii, care de altfel pot fi examinate direct in literatura indicata in bibliografii. Datorita scaderii continue in numeroase agentii guvernamentale din strainatate a procentajului de proiecte finantate (ex. La Institutele Nationale de Sanatate (NIH) din SUA, scaderea a fost de la 62% (1970), la 46% (1975), 35% (1985) si apoi la 18% (1990-1992).

Fundația Națională pentru Știință (NSF) (SUA) experimentează în prezent alocarea de granturi cu buget fix predeterminat (10.000-30.000$). În fața unei extrem de

proliferate birocrației, a unei imense cantități de hârtie consumată (anual la NIH, cca. peste 1000 tone), a timpului investit de mulți cercetători pentru scrierea unei oferte de proiect (cca. 60-70% din timpul de lucru), se încearcă folosirea unui sistem total computerizat atât pentru elaborarea cererii cât și pentru evaluarea ei: Electronic Application Grant, în curs de experimentare la NIH și NSF.

De remarcat că, în timp ce majoritatea țărilor cu știință avansată sunt marcate de limitarea fondurilor bugetare alocabile prin granturi competitive, Japonia raportează o recentă creștere cu cca. 10% a acestor fonduri. Există unele voci, de altfel puține ca număr, care consideră competiția în știință ca ajunsă la un grad dăunător de duritate cu potențiale efecte negative asupra confortului intelectual al unor cercetători. În pofida acestor posibile neajunsuri și în lipsa unei alternative mai bune, sistemul granturilor continuă să domine finanțarea științelor, îndeosebi a celor fundamentale și direcționate ("targeted") fiind convingător, justificat prin progresele substanțiale înregistrate în cercetarea finanțată prin competiție.

2. EVALUAREA PROPUNERILOR DE CĂTRE COMISIILE DE SPECIALIȘTI ("PEER REVIEW")

In majoritatea țărilor, mecanismul de evaluare si selectare a cererilor de grant este definit sub denumirea de "peer review". Deși in conotația sa actuală acest termen are un sens mai cuprinzator (o examinare imparțială, critică dar colegială si nobilă), semnificația inițială a cuvantului "peer" derivă din cuvantul "par" (egal) prin care se subliniază ca evaluatorul trebuie să fie de un rang (calificare) cel putin egală cu cea a solicitantului. Colocvial, termen de substituție utilizați de unii critici ai acestui sistem au mers pana la denumiri că "prietenoasa inchiziție" (friendly inquisition) pe aceeași linie, un "peer" este, în unele țări, numele dat unui expert, membru al unei astfel de comisii de evaluare.

În esență, evaluarea reprezintă elementul de bază al sistemului de granturi competitive. Descrierea amănunțită a întregii proceduri de acordare a granturilor (în particular GAR) va fi redată în articole ulterioare. În cel de față, intenționăm doar să punctăm unele caracteristici de bază ale procesului de evaluare a cererilor de grant, așa cum se efectueaza în țările cu experiență în acest sistem.

Comisiile sunt alcătuite pe domenii, funcționând fie permanent, fie ad-hoc. Membrii comisiilor (5-12) persoane, la nevoie chiar cu participarea unor experți străini), inclusiv coordonatorii lor, sunt numiți dintre specialiști recunoscuți, atât prin valoarea lor științifică deosebită, cât și prin calitățile lor morale dintre care imparțialitatea, probitatea și confidențialitatea sunt absolut necesare procesului de evaluare. În unele țări, numele celor aleși în comisiile de evaluare sunt făcute publice de la inceputul

acțiunii. Aceasta face parte din transparența totală sub care trebuie să se desfășoare mediatizarea, accesul, analiza, evaluarea și finanțarea proiectelor selecționate. Fiecare ofertă de proiect trebuie examinată și evaluată în scris de către cel putin 3 membri ai comisiei, pe baza unor criterii principale, adaptate corespunzator la particularitățile disciplinei respective:

a) meritul științific, originalitatea, importanța potențială a rezultatelor scontate, raportarea lor la cunoștințele deja existente în domeniu;

b) soliditatea gândirii și construirii proiectului și fezabilitatea lui;

c) experiența și performanțele anterioare ale solicitanților capabile să confere șanse suficiente pentru realizarea proiectului propus;

d) condițiile tehnice, de informare, interacțiuni, colaborări, care pot asigura abordarea adecvată a proiectului, factorii de risc, căi alternative;

e) costurile implicate, eligibilitatea cheltuielilor conform cu specificațiile anunțate de consiliu GAR pentru diferitele tipuri de granturi ce le poate finanța (salarii, aparatură, materiale consumabile etc).

Evaluarea se exprimă pe o scara de notație, conventional stabilită în ordine crescătoare de la 1 la 5, 1 la 10 sau invers de la 5 la 1 (ca in SUA).

Odată cu descrierea propriu-zisă a proiectului (făcută pe un formular tip) solicitantului i se cere de asemeni depunerea și a altor materiale care facilitează si substantiază evaluarea (curriculum vitae et studiorum, lista de publicații si extrase ale acestora, acordul institutiei tutelare si al colaboratorilor etc). Practic, pentru fiecare tip de grant se cere un anumit mod de prezentare a cererii, o categorie specială constituind-o programele de interes național, granturile pentru echipamente unicat de inaltă tehnicitate s.a. Asupra acestora vom reveni cu materiale adecvate.

Sistemul de evaluare prin comisii de experți ("peer review") nu a fost scutit de insistente critici, cele mai puternice venind din partea unor specialiști italieni si francezi. Principalele obiecții sunt centrate in jurul urmatoarelor puncte (enumerarea acestora nefiind exhaustivă):

(i) în disciplinele cu o rapidă dezvoltare si reînnoire, cât de adecvat poate fi asigurată componența consiliilor de evaluare? Soluția ar fi lărgirea sau îngustarea componenței acestora?

(ii) componența comisiilor nu trebuie să țină seama decât de calificarea științifică și nu de considerente geografice, minoritățti etnice, sex ș.a.;

(iii) folosirea adecvată a indicilor bibliometrici trebuie extinsă;

(iv) este dificil de protejat ideile noi de cei care le examinează;

(v) o știință potențial creatoare este greu de evaluat deoarece este nouă;

(vi) mecanismul judecării contestațiilor este incă rudimentar pus la punct;

(vii) sistemul actual îi avantajează pe cei care scriu mai bine, ceea ce nu este o calitate obligatorie pentru orice creator de știință.

Acest set de criterii se aplică îndeosebi granturilor individuale sau de grup. Evaluările comisiilor sunt validate de Consiliul organismului acreditat cu coordonarea acordării granturilor in cauză, iar rezultatele finale sunt comunicate in scris solicitanților și făcute publice. Finanțarea poate fi făcută pentru perioade de 3-5 ani, dar reînnoirea ei anuală este riguros conditionată de primirea din partea beneficiarului de grant a unui raport detaliat asupra rezultatelor parțiale obținute și folosirii adecvate a fondurilor primite.

Există un consens general conform căruia actualul sistem de evaluare, cu diversele lui variante, necesită o continuă reevaluare de către însiși cei ce sunt implicați în aplicarea lui, sau beneficiază de acest mod de finanțare. Recent au fost formulate diferite propuneri, dintre care unele par a fi asimilate deja in sistem. Câteva exemple:

i) să se pună un mai mare preț pe performanțele anterioare ale solicitantului ("evaluare retrospectivă");

ii) acordarea unui numar mai mare de "granturi modulare" cu buget relativ moderat, prefixat, lăsat la libera folosință a beneficiarului; aceasta ar crește numărul tinerilor cercetatori finanțați prin granturi competitive;

iii) participarea celor mai calificați oameni de știintă in comisiile de evaluare trebuie considerată o datorie civică majoră cu atât mai mult atunci când aceștia au fost sau sunt beneficiarii unor astfel de granturi;

iv) apare promițător sistemul de înregistrare si evaluare computerizata a cereriloe de grant, dar elaborarea lui in detaliu și dovedirea eficientei si acurateței unei astfel de tehnologii necesită înca susținute experimentari.

Combinând unele dintre sugestiile de mai sus, o interesantă recomandare propune ca alternativă la actualul sistem convențional de "peer review" un mecanism de evaluare "bicamerală". Conform cu acesta o cerere de grant ar trebui sa conțină doua părți distincte: una "retrospectivă" și alta "prospectivă". Partea retrospectivă care descrie ce s-a realizat până atunci (rezultate publicate sau nepublicate) va fi trimisă separat la comisia de evaluare, care va estima valoarea performanțelor în raport cu fondurile primite. Partea prospectivă va fi înaintată unui grup de specialiști în finanțe și scientică aparținând agenției care finanțează. Aceștia vor decide asupra bugetului ce se justifică și, în cooperare cu evaluatorii primei părți, pot face recomandări de căi mai economice de a realiza proiectul. Evident, nici acest sistem "bicameral" nu este în afara criticilor.

Ținând seama de avantajele și limitele sistemului de granturi competitive, de faptul că este utilizat de peste patru decenii și adoptat de care marea majoritate a țărilor care, cel puțin în parte, finanțează de la buget cercetarea fundamentală, Academia Română și-a conturat propriul sistem de finanțare după experiențele cele mai puțin criticabile obținute de diferite organisme de finanțare din țările cu știință avansată.

ACTIVITĂȚILE PROFESORULUI NICOLAE SIMIONESCU
ÎN ANUL ÎN CARE A FOST VICEPREȘEDINTE AL ACADEMIEI ROMÂNE
(FEBRUARIE 1994 - FEBRUARIE 1995)

ACTIVITĂȚILE PROFESORULUI NICOLAE SIMIONESCU ÎN ANUL ÎN CARE A FOST VICEPREȘEDINTE AL ACADEMIEI ROMÂNE (FEBRUARIE 1994 - FEBRUARIE 1995)

A. ACȚIUNI ORGANIZATORICE PRIVIND CERCETAREA ȘTIINȚIFICĂ ÎN ACADEMIA ROMÂNĂ

(1) Inițierea "Planului de Acțiuni pentru Îmbunătățirea Cercetării Științifice în Academia Română", aprobat de Adunarea Generală 11 mai 1994 (publicat în Academica IV/8 (44), 1994, p.15-18). Formarea și interacția cu 14 grupe de lucru pentru elaborarea propunerilor de măsuri.

(2) Inițierea "Sistemului de Finanțare Competitivă a Cercetării Științifice prin Granturile Academiei Române (GAR)" și alcătuirea împreună cu alți colegi a Consiliului GAR și a Regulamentului de acordare a Granturilor, aprobate de Prezidiu și Adunarea Generală la 8 noiembrie 1994 și publicate în Academica, 2 (50), decembrie 1994, p. 15-18.

B. ACȚIUNI ORGANIZATORICE PRIVIND CERCETAREA ȘTIINȚIFICĂ PE PLAN NAȚIONAL

(1) Elaborarea, în colaborare cu ceilalți membri ai grupului de lucru în Proiectul Băncii Mondiale a studiului "Direcții ale Reformei în Activitatea de Cercetare Științifică și Dezvoltare Tehnologică din România". Particularizarea unor propuneri privind rețeaua instituțională a Academiei Române.

(2) Introducerea prin intermediul Comitetului Național de Biotehnologie Avansată a unui sistem de granturi competitive pentru (a) proiecte de cercetare și (b) laboratoare metodologice de biotehnologie moleculară (ADN recombinat, anticorpi monoclonali, culturi de celule). Propunerile selecționate de comisii de specialiști, au fost parțial finanțate de Ministerul Cercetării și Tehnologiei (18 proiecte și 14 laboratoare metodologice).

(3) Ca președinte al Comisiei de Biotehnologie a Colegiului Consultativ pentru Cercetări Aplicative și de Dezvoltare, a organizat evaluarea ex-ante a propunerilor de proiecte de biotehnologie printr-un sistem de "peer review". Au participat 36 de specialiști ce au evaluat 75 cereri de finanțare. Recomandările comisiei au fost transmise conducerii MCT.

(4) Analiza și formularea de observații privind proiectul Legii Cercetării și Legii

Învățământului. Discutarea acestor observații în cadrul Comisiilor de specialitate ale Camerei Deputaților, Senatului, Consiliului de Coordonare, Strategie și Reformă Economică al Guvernului României.

(5) Elaborarea, împreună cu împuterniciții Ministerului Cercetării și Tehnologiei și ai Ministerului Învățământului, a unor propuneri privind "Strategia cercetării științifice și dezvoltării tehnologice în România", material solicitat de Consiliul pentru Reformă Economică al Guvernului și de Președinția României.

C. ALTE ACȚIUNI PROFESIONAL-ȘTIINȚIFICE PE PLAN NAȚIONAL

(1) Organizarea, împreună cu Dr. G. Levi (Ecole Normale Superieure - Paris) a unui Curs Internațional de Tehnologie in Biologie Moleculară, Sibiu, iunie 1994. 28 de cursanți români, prelegeri și demonstrații practice ținute de specialiști din Franța, Italia și România.

(2) Organizarea împreună cu Prof. A. Combiescu, Dr. C. Știrbu și Dr. D. Balazs a Colocviului Româno - Francez pentru comemorarea Anului Pasteur - 1995, ce a avut loc la București între 4 și 6 octombrie 1995 (vezi Academica, 2 (50), decembrie 1994, p. 32), sub egida Academiei Române, Institutului Cantacuzino și Institutului Pasteur.

(3) Participarea, în calitate de Vicepreședinte, la lucrările Comisiei Superioare de Atestare și la întâlnirile biroului acesteia cu comisiile de specialitate ale Camerei Deputaților și Senatului.

(4) Alocuțiunea privind "Contribuția Academiei Române la protejarea integrității mediului", cu ocazia adunării festive consacrată "Zilei Mondiale a Mediului", București, 1994.

D. PARTICIPAREA LA ACȚIUNI PROFESIONAL - ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE

(1) Participarea, în calitate de Coordonator național al Programelor de Cooperare cu Comitetul Științific NATO, la reuniunea acestui organism, ținută la Bruxelles (17-18 martie 1994), unde a prezentat raportul "Current Activities that could be subject to Cooperation under NATO Science Programme" referit în darea de seamă a reuniunii (publicat în Academica, p.32, apr. 1994)

(2) Participarea la elaborarea unor propuneri privind realizarea, în cadrul Programelor Prioritare NATO, unor "Advanced Study Institutes" și "Advanced Research Workshops", pentru anii 1995-1996 împreună cu cercetători americani (prof. N. Kefalides, Philadelphia, USA) și greci (Porto Caras, Grecia), iulie 1994.

(3) Participarea ca invitat de onoare la deschiderea oficială a Bibliotecii Universale, din Szentes, Ungaria, 18-20 aprilie 1994. În cadrul Simpozionului Inaugural Acad. Nicolae Simionescu a prezentat conferința "The cells, a wisdom in identity and integration". Participarea împreună cu Acad. Maya Simionescu la întrunirea "Comitetului Director și de Planificare" al "Universității Internaționale a Europei Centrale" (vezi raportul publicat în Academica, mai 1994, p. 32).

(4) Urmare a invitației Institutului Pasteur din Paris, în perioada 23 octombrie-2 noiembrie, în calitate de președinte al Comitetului de Organizare Acad. Nicolae Simionescu.împreună cu Acad. Maya Simionescu și Prof. Combiescu au inițiat discuții cu privire la stabilirea programului preliminar al Comemorării Anului Pasteur, în perioada 4-6 octombrie 1995, la București, sub egida Academiei Române.

(5) Participarea în calitatea sa de membru în Comitetul de Selecție pentru acordarea Premiului "The Ettore Majorana Prize Erice: Science for Peace", Erice, Italia, 1994.

(6) Elaborarea raportului ce urma a fi prezentat la Sesiunea Comitetului Științific NATO de la Budapesta la 23-24 martie 1995. Din nefericire, "timpul nu a mai avut răbdare", iar acest din urmă punct nu a mai putut fi bifat în agenda de lucru a Prof. Nicolae Simionescu, căci, asemenea multor altor gânduri nerostite, planuri abia schițate sau idei îndrăznețe, în dimineața zilei de 6 Februarie 1994, Profesorul le-a luat cu sine, trecându-le în eternitate.

REVISTE INTERNAȚIONALE: DESPRE PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU

ARTICOL APĂRUT ÎN REVISTA „NATURE", VOL. 344, 1990

Aside from his mailing address, there is little to distinguish Nicolae Simionescu from other cell biologists. He publishes in international journals, edits chapters of books, attends conferences and spends as much time as he can in the laboratory.

What is unique about Simionescu is that he does all this under surreal conditions in his native Bucharest, where he is director of the Institute for Cellular Biology and Pathology (ICBP). The institute specializes in the cell biology of the cardiovascular system.

ICBP appears to be the only institute in Romania that has been able to keep up with Western labs. This is no slight to other researchers in Romania, who can be justifiably proud of what they have achieved, sometimes using considerable ingenuity to make up for a lack of resources. But in most cases, working with equipment 20 years old or more and in isolation from the rest of the world has taken a severe toll.

Simionescu, 64 years old and a physician by training, is the first to admit that setting up the institute would not have been possible had he not first left Romania to work in the United States for ten years.

Simionescu began to negotiate with the Romanian government in 1972 about opening an institute. He and his wife, Maya, were professors at the Rockefeller University in New York and did not have to go back to Romania. "My American friends called me a superstitious patriot" for pursuing the "crazy idea" of an institute in Bucharest, he says. "But I persevered." The Simionescus designed ICBP themselves – "every mistake you see is ours," they say. They returned annually to Bucharest to supervise construction until ICBP was finally completed in 1979.

Negotiating from strength, Simionescu insisted that he and Maya be allowed to keep their faculty positions at Yale, where they had moved in 1973. And they insisted that they be allowed to "hand-pick" the institute staff of 140 and have their top people trained in the United States.

Maintaining Western contacts turned out to be essential when, in 1980, government support in the form of hard currency "dried up" and the Simionescus were on their own in purchasing books, journals and laboratory supplies. Since then, a renewable grant from the US National Institutes of Health (NIH) has kept ICBP alive. The grant is the only one NIH gives to Eastern Europe and one of only 7 (out of 5,000) given to non-US groups.

"Our library became utterly dependent on donations from people we knew in the States", recalls Maya Simionescu. Nevertheless, the library became a "magnet" to other researchers in Bucharest who could not read the literature anywhere else.

Life in Bucharest has not been easy. In addition to living with "paranoid" restrictions like only using a single light bulb in a room, Simionescu has had occasional confrontations with the Communist authorities. "Once, a man from the government

came and asked us if we knew about membranes," says Simionescu. "He wanted us to produce some kind of filters for industry. We had to explain that our area is cell membranes."

The Simionescus have had answer to the authorities in both Romania and the United States because of their frequent travel. "Both the Securitate [Romanian secret police] and the FBI thought we were sellings secrets,' says Simionescu.

But aside from these conflicts – and the occasional accusation of "growing up a special breed of apolitical investigators," the government" did not dare to bother us much," says Simionescu.

"Of course, we provided them every year with a propaganda coup – we kept returning from the States" to Communist Romania, he says, The revolution came none too soon for Simionescu, who says that the political situation had deteriorated dramatically in the last five years.

Since then, nothing and everything has changed. Simionescu does not anticipate receiving any new money from the government beyond what ICBP already gets, which poses problems for replacing equipment long overdue for overhaul. Nevertheless, he is "very optimistic" about the future of the institute and Romanian science in general. Says Simionescu, "At least now we can turn the lights on."

"BOOTSTRAPPING A NEW INSTITUTE" ARTICOL APĂRUT ÎN REVISTA „NATURE", VOL. 372, 1994

Bucharest. The jewel in the crown of the Romanian Academy of Sciences is the Institute of Cellular Biology and Pathology, run by the husband-and-wife team Nicolae and Maya simionescu.

A thriving centre, with 130 staff, 50 of them scientists who have mostly worked abroad, the institut is one of the very few in Romania performing world-class research. It concentrates its efforts on the molecular and cell biology of the cardiovascular system, with particular reference to atherosclerosis.

The centre did not attain this position easily. Its present status is entirely the product of the determination of its director to provide a haven for good science in his home country despite the almost impossible political situation.

Nicolae Simionescu made his escape from Romania in 1970 when, after a year-long struggle, he got a visa to visit the United States. He spent the next three years as a research fellow at the Rockeffeller University and then moved to Yale, where he eventually became a professor.

Despite his success across the Atlantic, Simionescu always wanted to return home to help make it possible to do good research work in Romania. In 1972, he sent the government a proposal for the building of an institute of cell biology, in which there were virtually no studies anywhere in Romania. His association with George Palade, a Noble prizewinner and Romanian expatriate, helped his cause; the

following year, the government approved the proposal in principle.

Simionescu agreed to return to run the institute under certain very strict conditions, the most important being that he would be allowed to spend a part of each year in the United States, and that he would be able to send his young scientific staff there for training.

After numerous delays, during which decisions were repeatedly made and unmade, the institute, reasonably equipped, finally came into being in 1979.

The Simionescus came home. But they were immediately told by the Ministry for Health and Education that funds had run out. The institute would receive funds only for salaries and maintenance costs.

For the succeding decade, the Simionescus survived on substantial grants from the United States – for a time, they were the only institute in eastern Europe to hold grants from the US National Institutes of health – and brought vast shipments of equipments and journals back with them from their annual visits to the United States. Customs records show that, between 1979 and 1992, they transported 14,000 kg of material, worth US$33,000.

In addition, Simionescu managed to send 16 young scientists to work in laboratories in the United States during the 1980s. Surprisingly, none defected: all returned to form the core staff of the institute.

The Simionescus established a number of traditions in their institute during the 1980s, in defiance of the government. One was to require all scientists to give regular progress reports of their projects in English, to ensure that language did not become a scientific barrier. They also held regular US-Romanian scientific workshops, bringing in US scientists, using US money.

The Simionescus have sought to nurture a broader appreciation of culture. They play taped classical music concerts in the common-room with information sheets about the composer taped to the tables, and have used their auditorium to hold cultural, as well as scientific, events. They celebrate Christmas – complete with Christmas tree and Santa Claus – for the staff and their children and insist that everyone takes the day off.

These actions regarded by the old regime as provocative, but they were tolerated. But as time went on, the institute began to be regarded with more and more suspicion by Ceausescu, culminating in his declaration in September 1989, at the height of his paranoia, that Simionescu was a US spy, selling Romania's scientific secrets. His visa, needed to allow him to complete his autumn lectures at Yale, where he was still a visiting professor, was withdrawn. After pressure from US scientists and the US embassy, he was belated allowed to.go. "It was a very scary time", he remembers thinking it would be his last trip. But when he returned in January 1989, the revolution had changed everything.

There can be no comparison between conditions now and then, says Simionescu, even though present is very far from ideal. Funds are now decreasing, not increasing. And although there is now complete freedom to travel, as often as not

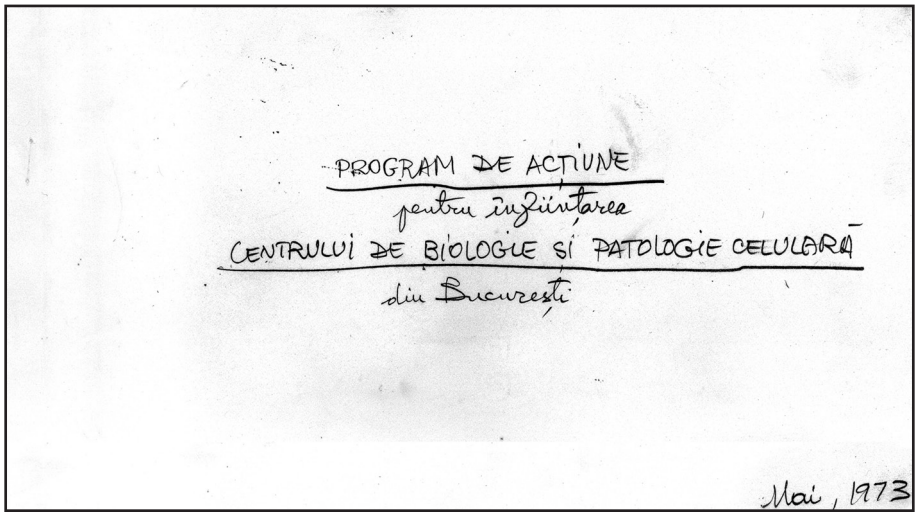
the young scientists who continue to be sent abroad for training no longer return. Indeed, some of those who resisted the temptation to defect during their periods abroad in the 1980s now want to leave. "They do not complain that they cannot do good researche here", says Simionescu; "It is mostly because the salaries are too low."

The Simionescus remain undaunted. Their strategy is to keep training new people, even is the returns are now likely to be lower.

Nicolae Simionescu is also devoting energy to encouraging reforms within the academy as a whole. He is also in charge of Romania's biotechnology programme and has arranged for a small amount of its funds to be set aside for competitive grants. This is, for the time being, the only example of competitive project money in Romania.

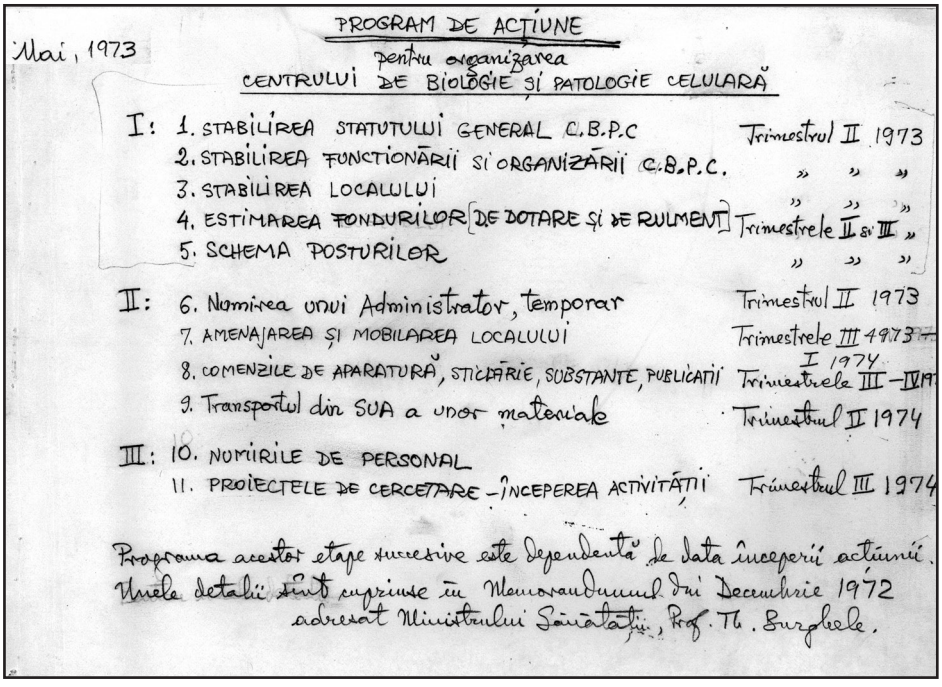
ETAPE ÎN REALIZAREA VISULUI

CONCEPȚIA



PROGRAM DE ACȚIUNE
pentru înființarea
CENTRULUI DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ
din București

Mai, 1973



Mai, 1973

PROGRAM DE ACȚIUNE
pentru organizarea
CENTRULUI DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ

I:	1. STABILIREA STATUTULUI GENERAL C.B.P.C	Trimestrul II 1973
	2. STABILIREA FUNCȚIONĂRII ȘI ORGANIZĂRII C.B.P.C.	" " "
	3. STABILIREA LOCALULUI	" " "
	4. ESTIMAREA FONDURILOR [DE DOTARE ȘI DE RULMENT]	Trimestrele II și III "
	5. SCHEMA POSTURILOR	" " "
II:	6. Numirea unui Administrator, temporar	Trimestrul II 1973
	7. AMENAJAREA ȘI MOBILAREA LOCALULUI	Trimestrele III 1973 — I 1974
	8. COMENZILE DE APARATURĂ, STICLĂRIE, SUBSTANȚE, PUBLICAȚII	Trimestrele III — IV 19
	9. Transportul din SUA a unor materiale	Trimestrul II 1974
III:	10. NUMIRILE DE PERSONAL	
	11. PROIECTELE DE CERCETARE - ÎNCEPEREA ACTIVITĂȚII	Trimestrul III 1974

Programa acestor etape succesive este dependentă de data începerii acțiunii. Unele detalii sînt expuse în Memorandumul din Decembrie 1972 adresat Ministerului Sănătății, Prof. Th. Burghele.

I. 1. STABILIREA STATUTULUI GENERAL AL CENTRULUI DE BIOLOGIE SI PATOLOGIE CELULARĂ

– 1973 –

Scopul: cercetări asupra funcționării, îmbolnăvirii și recuperării celulelor, în special a celor umane,

Denumirea: Centrul de Biologie și Patologie Celulară (CP) [CBPC]

Apartenență: unitate autonomă, aparținând rețelei de cercetare a Ministerului Învățământului sau a Ministerului Sănătății

Subordonare: dublă: Ministerul Sănătății [în special pentru activitatea de cercetare] și Ministerul Învățământului [pentru activitatea didactică, recrutarea și pregătirea de doctoranzi și specialiști].

Obiective: a. Cercetare de biologie și patologie celulară, în special umană
b. Învățământ de specialitate
c. Formare de specialiști
d. Dezvoltarea diverselor activități științifice din domeniul biologiei celulare

Unitatea va fi patronată și susținută în activitatea ei de către Prof. G.E. Palade [Rockefeller University, New York], din toamna 1973, la Univ Yale – New Haven, USA

I: 3. STABILIREA LOCALULUI

Conform specificului funcțional și dotării laboratoarelor de specialitate și serviciilor anexe [pct. I 2]:
– construcție nouă sau
– construcție existentă adecvată, care va fi reamenajată corespunzător

[Anexa 1 [Solicitare de fond] a Memorandum-ului din Dec. 1972]

I: 4. ESTIMAREA FONDURILOR ALOCATE DOTĂRII și A FONDULUI DE RULMENT

FONDURILE INITIALE ALOCATE

a. Pentru amenajarea și mobilarea clădirii

b. Pentru dotarea cu echipament: – valută Vest
– valută Est
– producție indigenă

c. Pentru procurarea de consumabile [chimicale, veselă, fotografice, publicații etc]: – valută Vest
– valută Est
– producție indigenă

FONDURILE DE RULMENT

a. Pentru servicii întreținere, piese schimb

b. Pentru cumpărarea de consumabile
– valută Vest
– valută Est
– producție indigenă

c. Fondul de salarii

I: 5. SCHEMA DE POSTURI

Personal de cercetare ± învățământ: [medici, biochimiști, biologi, inginer etc]

– 10–12 poziții permanente [conform organizării și dominării sub imitatilor de lucru]

– 8–10 " nepermanente [asociați în cercetare pe 1-2 ani]

Personal technic ajutator

– inginer electronist
– tehnicieni electroniști : 2
– " microscopiști = 4
– " biochimiști = 4
– " radioizotopiști : 1
– " fotografi = 2
– " mecanică fină = 1
– laboranți = 8
– bibliotecar-documentarist = 1
– secretară-dactilografă = 1
– sticlar = 1

Personalul de îngrijire: corespunzător spațiului de întreținut

Personalul Vivarium-ului: medic veterinar, 2 tehnicieni veterinari, 2 laboranți, 4 îngrijitori de animale.

II: 6. Numirea unui Administrator, temporar

pentru supravegherea: — amenajării localului
— mobilarea și dotarea laboratoarelor
— importul de aparate și substanțe etc

7. AMENAJAREA ȘI MOBILAREA LOCALULUI — vezi și pct I3 —

Conform Schiței de plan [Anexa 1 la Memorandum-ul din Dec 1972] ce va fi amănunțită și completată cu indicațiile privind construcțiile speciale:

— Camerele frigorifice și instalația termostat
— Nisele exhaustoare și nisele cu flux laminar
— Amplasarea aparaturii, surselor de apă, electricitate, vacuum etc
— Instalațiile centrale pentru apă distilată, vacuum, frigorime
— Mobilierul de laborator, consolele
— Laboratorul fotografic și camerele obscure
— Vivariumul

II: 8. LISTELE ȘI COMENZILE DE APARATE, SUBSTANȚE, PUBLICAȚII etc

LISTELE: [fr. II-III 1973]

a. Echipamentul de specialitate, import Vest: lista prezentată ca Anexa 2 la Memorandum-ul din Dec-1972
b. Aparate, import Est
c. Aparate, producție indigenă
d. Sticlărie import
e. " producție indigenă
f. Chimicale și fotografice, alte consumabile, import
g. " " " , producție indigenă
h. Cărți și abonamente la reviste de specialitate
i. Mobilier

Ulterior se va face planificarea de consumabile anual pt 1975-76

COMENZILE: pot fi efectuate în trimestrul III 1973

LIVRĂRILE: pentru trimestrele II și III 1974

9 TRANSPORTUL DIN SUA AL UNOR MATERIALE

III: 10. NUMIRILE DE PERSONAL

. Conform necesarului indicat la punctul I5.
. Începînd cu următorul an școlar vor fi recrutați și un număr de doctoranzi interesați în a lucra în domeniu și a-și face lucrarea de diplomă în cadrul CIBPC.

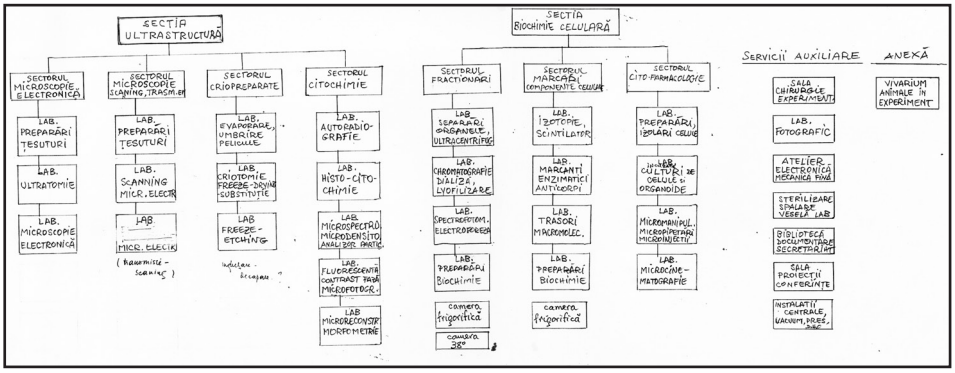
III: 11. STABILIREA ~~PROIECTELOR~~ DE CERCETARE ȘI ÎNCEPEREA ACTIVITĂȚII

a. Cercetarea : conform proiectelor de cercetare și a acordului de colaborare cu unitatea Prof C Palade (SUA). = trimestrul III 1974

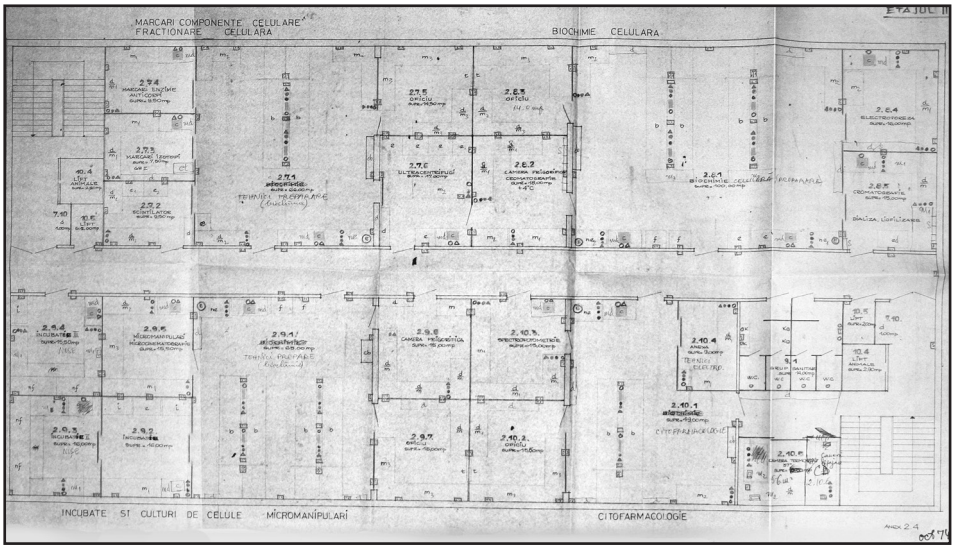
b. Învățământul : cursul de Biologie și Patologie Celulară poate începe ~~în~~ în cursul anului școlar 1974-75

Ss. N. Simionescu

Octombrie 1974



Octombrie 1974



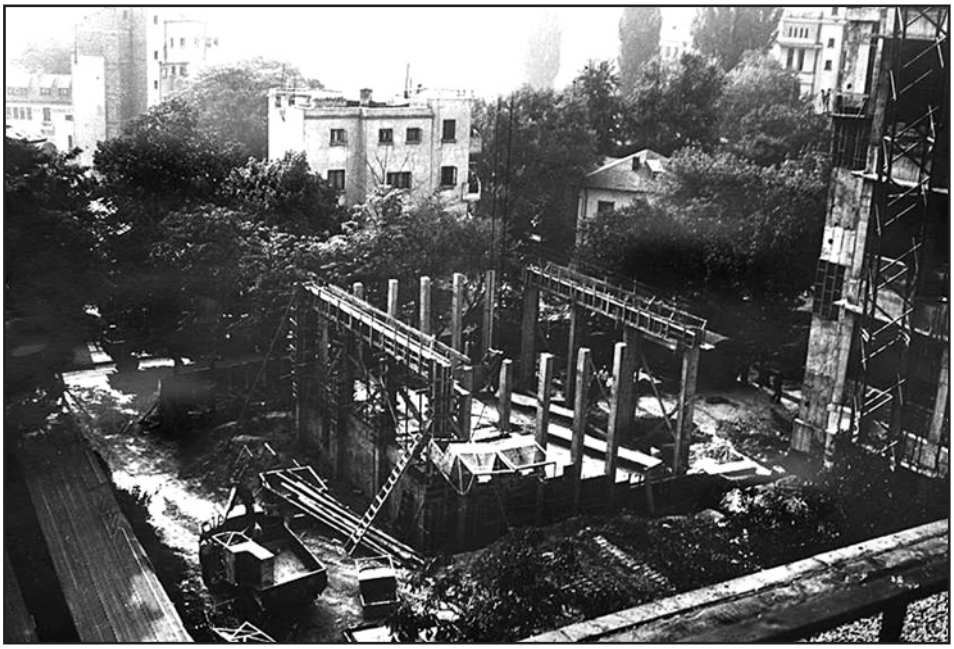
CONSTRUCȚIA

COLECTIV DE PROIECTARE:
ARHITECTURĂ: arhitecții **IOAN ANTONESCU** (șef proiect), **ȘERBAN PROVIAN, ANCA MUNTEANU, ION ȘTEFĂNESCU, CORINA ASLAN,** proiectant **JOSEFINA GEORGESCU**
REZISTENȚĂ: ing. **EUGEN ȚIGĂNESCU**
INSTALAȚII: inginerii **VALENTIN DRĂGĂNESCU, ANCA MARINESCU** (electrice), **VENERA GHEORGHIU, MIHAI VOICULESCU** (sanitare și fluide speciale), **CONSTANTIN BUZDUGAN** (ventilație, climatizare), **MARCELA COLIU** (termice)
DRUMURI ȘI SISTEMATIZARE VERTICALĂ: ing. **CORNELIU ANGELESCU**
MOBILIER: arh. **AGRIPA POPESCU**
PROIECTANT GENERAL: CENTRUL DE PROIECTARE PENTRU CONSTRUCȚII DE ÎNVĂȚĂMÂNT ȘI DE CERCETARE AL MINISTERULUI EDUCAȚIEI ȘI ÎNVĂȚĂMÂNTULUI
CONSTRUCTOR: CENTRALA DE CONSTRUCȚII MONTAJ A MUNICIPIULUI BUCUREȘTI
CONSULTANT DE SPECIALITATE: PROF. DR. NICOLAE SIMIONESCU

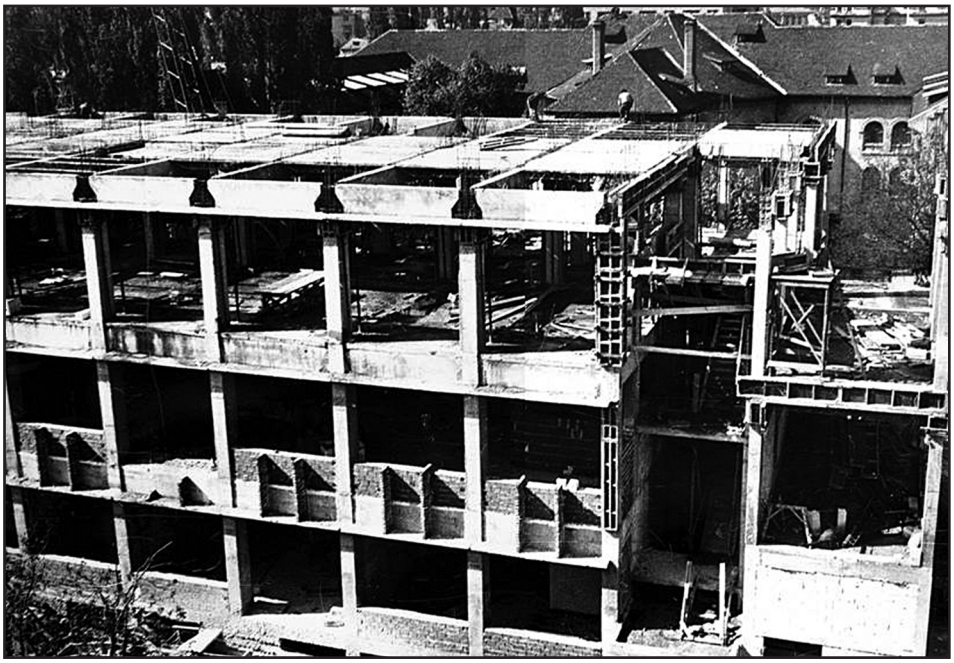
Alegerea locului (1973)

Se pun temeliile (1974)

Şantier (1977)

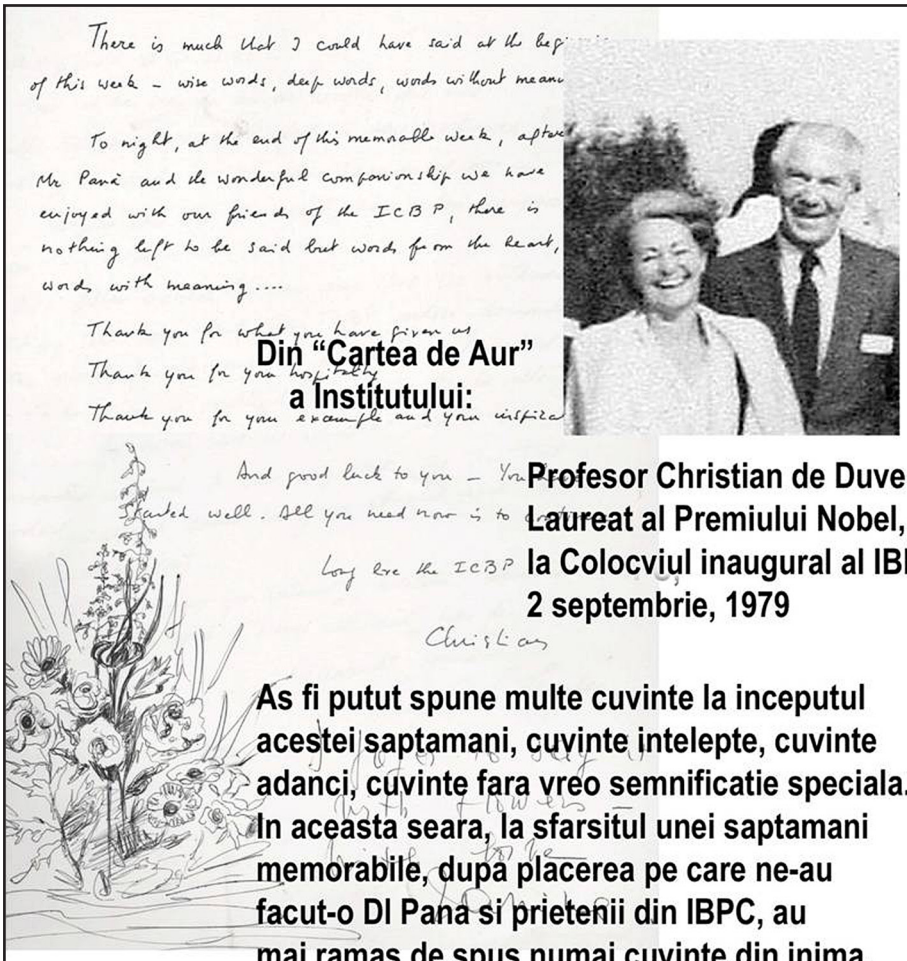


Ridicarea clădirii (1977)



Institutul - Casa noastră științifică
(1979}

AMINTIRI



There is much that I could have said at the beg
of this week - wise words, deep words, words without meanu

To night, at the end of this memorable week, after
Mr Pana and the wonderful companionship we have
enjoyed with our friends of the ICBP, there is
nothing left to be said but words from the heart,
words with meaning....

Thank you for what you have given us
Thank you for your hospitality
Thank you for your example and your inspira

And good luck to you - You
started well. All you need now is to

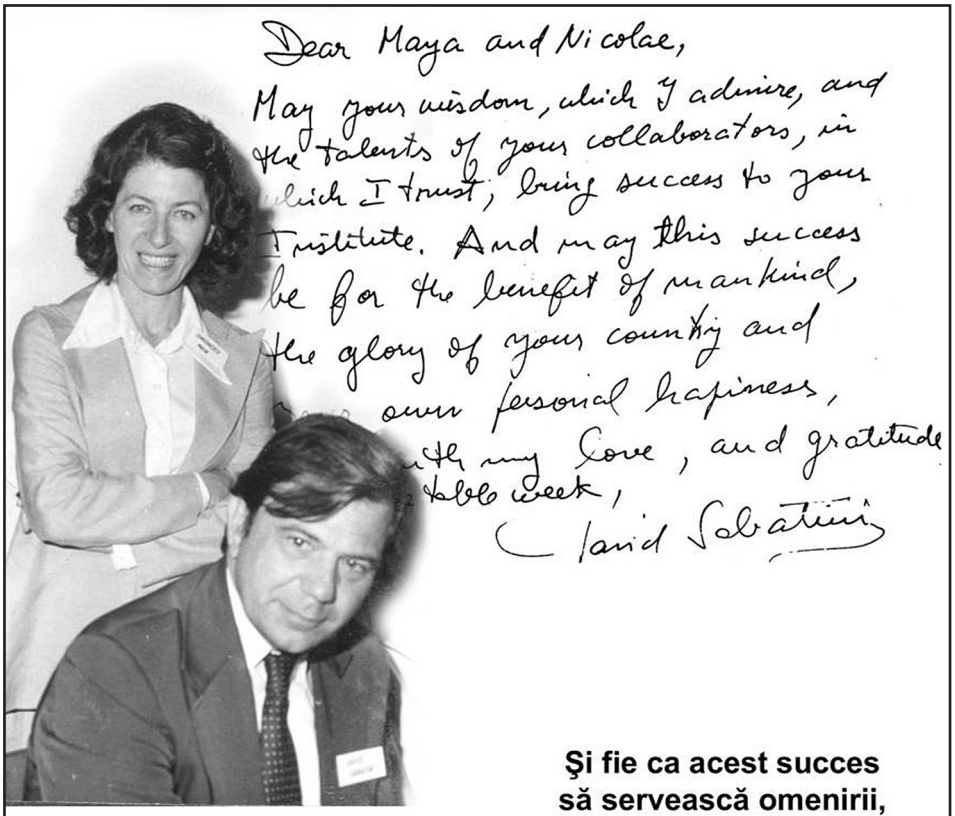
Long live the ICBP

Christian

Din "Cartea de Aur" a Institutului:

Profesor Christian de Duve, Laureat al Premiului Nobel, la Colocviul inaugural al IBPC, 2 septembrie, 1979

As fi putut spune multe cuvinte la inceputul acestei saptamani, cuvinte intelepte, cuvinte adanci, cuvinte fara vreo semnificatie speciala... In aceasta seara, la sfarsitul unei saptamani memorabile, dupa placerea pe care ne-au facut-o Dl Pana si prietenii din IBPC, au mai ramas de spus numai cuvinte din inima, cuvinte cu o semnificatie speciala.....
Va multumesc pentru ce ne-ati oferit.
Va multumesc pentru ospitalitate.
Va multumesc pentru exemplu si inspiratie.
Va doresc succes. Ati inceput bine.
Trebuie sa continuati. Sa traiasca IBPC.



Dragă Maya şi Nicolae,

Fie ca înţelepciunea voastră - pe care eu o admir – şi talentul colaboratorilor voştri – în care eu cred – să aducă mult succes institutului vostru.

Şi fie ca acest succes să servească omenirii, gloriei patriei voastre şi propriei voastre fericiri. Cu toată dragostea şi recunoştinţa pentru această săptămână de neuitat.

David Sabatini

EMOȚIA ȘTIINȚEI

Unul dintre dumneavoastră m-a întrebat ieri: „Cum se poate câștigă un Premiu Nobel?" Am știut că este o glumă. Aș vrea însă să dau un răspuns serios la întrebarea aceasta: „Nu lucrați cu scopul Premiului Nobel".

În viață se întâmplă ca un cercetător/o cercetătoare să dobândească o apreciere, ca un premiu, o invitație de a susține o conferință la un congres important, să fie ales/aleasă ca membru al unei academii, să obțină un grad onorific sau alte semne de apreciere. Problema este, însă, că astfel de aprecieri au loc foarte rar și de obicei foarte târziu în viață. Un om care intră în domeniul științei cu scopul de a obține o apreciere este absolut nebun. Recompensele și aprecierile din știință sunt cu totul altele.

Emoția științei este atunci când nu poți dormi noaptea gândindu-te la problema care te frământă, întorcând-o pe toate fețele în mintea ta, luptându-te cu ea până când îți vine în minte o idee, o explicație posibilă, o nouă cale experimentală care ar putea conduce la o soluție.

Emoția științei este atunci când nu ai răbdare să ajungi dimineața la laborator și să-ți experimentezi ideea făcând experimentul la care te-ai gândit.

Emoția științei este rezultatul experimentului, plăcerea aproape senzuală a atingerii pipetelor, eprubetelor, a instrumentelor de măsură și a microscoapelor, bucuria fizică a folosirii mâinilor tale cu iscusință și cu acuratețe.

Emoția științei este atunci când începi să vezi primele rezultate… și îți dai seama, cum se întâmplă adesea, că a fost ceva greșit în experiment și el trebuie refăcut sau că este ceva greșit în ideea ta și trebuie să o regândești.

Emoția științei este atunci când ai adunat destule rezultate și începi să le scrii pentru publicare, aruncând la coș versiune după versiune, până când, în final, ajungi la ceva care crezi că merită a fi publicat…, pentru că după câteva săptămâni să primești înapoi manuscrisul văzut de referenți cu observațiile acestora mai mult sau mai puțin amabile.

Emotia științei este de a-ți vedea lucrarea aparută, de a primi primele cereri de extrase și de a realiza că undeva, la celălalt capăt al pământului se află cineva chiar interesat în ceea ce ai făcut.

Emoția științei este aceea de a te simți parte a unei echipe, de a interacționa cu prietenii și colegii tăi indiferent dacă în discuții aprinse sau în împărtășirea satisfacțiilor, și, la o scară mai largă, de a te simți parte a unei rețele mondiale, a comunității internaționale cu aceleași scopuri, interese și standarde.

Acestea sunt recompensele zilnice, de ne înlocuit și cu o valoare imensă. Dacă totuși – oameni suntem – doriți și o asigurare dinafară, pe lângă satisfacțiile personale, atunci sfatul meu este: încearcă să câștigi respectul celor pe care tu însuți îi respecți.

Profesor Christian de Duve
Laureat al Premiului Nobel
Cuvânt la masa de adio IBPC, București, 7 septembrie 1979

A POEM FOR MAYA AND NICOLAE ON THE OCCASION OF THE WORKSHOP ON THE BIOLOGY OF THE VESSEL WALL BANQUET – 25TH AUGUST, 1983

BY MORRIS J. KARNOVSKY

Many miles we did fly
To visit Maya and Nicolai,
We came from places far away
As Australia & the USA.
And at this unique Institute
With admiration were struck mute.
If Harward my labs ever renovate in effect,
Nicolai will be my consulting architect,
Of talks we had nothing but the best,
And by the posters were most impressed.
First I learnt that if I mispronounce Simionescu
Guido Majno would come rushing to my rescue.
So I will not try, & in affection call them
Maya & Nicolai.
We also heard that a violin string,
Was a basement membrane, or some such thing.
Majno showed novel observations
On smooth muscle herniations,
Maya's elegant microdomains
A lot of physiology explains,
Folkman may have the answer
To a future cure for cancer.
Of my own work I'll not speak
But I'm pleased junctions may have sprung a leak!
Haulica's rennin, extra-renal
Is even in the pineal,
Curry's talk most efficient
Made easy reflection coefficient.

The b.m. architecture glomerular
Was beautifully expounded by Farquhar,
Grotendorst in his talk
Showed cells can take a walk,

And when they really get into the act
They can even chemotact.
Nicolai had lots to tell
Of new pathways for LDL,
This news he did boldly assert
Even though he wore no shirt!
Steinberg gave a witty catechism
On lipoprotein catabolism,
Joris showed that athero in the rat
Told something new & not old that.
Velican did on us impress
How athero in man does progress.
How it's hard to know how to follow,
Since Bob, Nick & George speak tomorrow!
However I will try
And will end – by – and – by.
Wissler will make a novel synthesis
To give our thinking new impetus.
Kefalides' virus will take a bite
And give endothelium a fright,
Palade will show us where we are
And what should be our guiding star.
Gabbi's music at lunch & dinner
Didn't help to keep us thinner.
I'm sure we'd all like to come back,
But Pepe & Nicolai must get the knack
Of learning how to drive,
So their guests will survive!
You will say I'm no poet,
I must admit that I know it,
And I can tell from your faces,
That I could stop & be in stasis.
But before I do let me say
We have seen such kindness at play
And it is absolutely unique
To provide such hospitality for a week!
So let us give a standing toast
To our lovely hostess & host,
And say with heartfelt tumult

"Mulțumesc foarte mult!"

To Nicolae and Maya,

We visited Ellis Island shortly after you arrived in New York this fall. As we walked the halls of the Immigration Museum, viewed the photographs, and thought at the aspirations of the people who had left Eastern Europe to escape totalitarian regimes, I could not help but think of the two of you and of your courage in maintaining liberal thought, personal dignity, freedom of inquiry, and the spirit of creativity at your Institute in Bucharest for more than a decade despite Ceausescu's totalitarism regime. You too could have left for an easier life in the United States. But you chose a much more difficult challenge. I respect your choice and admire you for it. In saying this I am reminded of Adlai Stevenson's remarks in appreciation of Eleanor Roosevelt. "She would rather light a candle than curse the darkness", he said of her. You have not only lit a candle, but you continue to nourish and treasure it.

With good wishes for the New Year,

Sam and Jo Ann Silverstein

12 December 1992

***

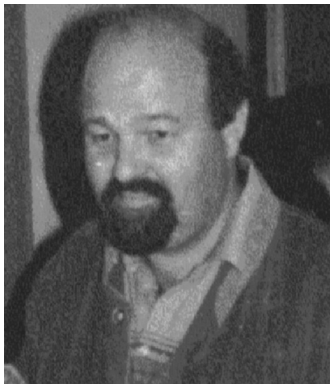
Pentru Maya și Nicolae,

Cu imensa apreciere pentru tot ce ați făcut și cu deosebită admirație pentru miraculoasa voastră reușită.
Nicăieri în lume nu găsești atâta știință adevarată, spirit elevat și mare curaj.
Voi sunteți un exemplu pentru noi toți.

Cu admirație,
Judah Folkman
Universitatea Harvard, Boston, SUA
29 august 1983

Colegilor și prietenilor mei – rare sunt ocaziile de a te bucura cu mintea și inima de plăcerea căutărilor științifice, așa cum le-am trăit în această săptămână cu voi aici în București!

Mulțumirile și afecțiunea mea.
Michael G. Gimbrone, MD.
1 septembrie 1989



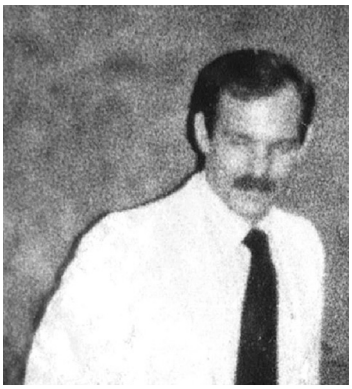
Dragă Maya,
Dragă Nicolae,

Au fost zile de neuitat: admir eforturile voastre herculeene de a construi nu numai un mare institut, ci și un centru de cercetare pentru întreaga țară.
Fie ca anii care vin să fie la fel de rodnici ca cei care au trecut.

Per aspera ad astra!

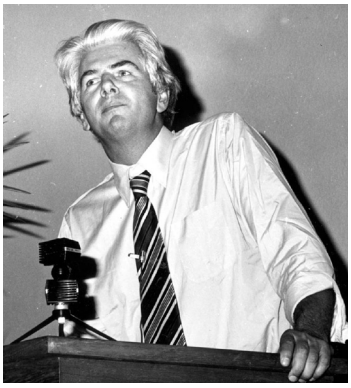
În numele unei vechi prietenii,
Cu mult respect,

Dontscho Kerjaschki
Profesor, Departamentul de Patologie,
Universitatea din Viena, Austria
3 septembrie 1989



Felicitările mele fiecărui membru al IBPC pentru dezvoltarea unui impresionant grup de oameni și de facilități de care dispune acest institut.
Recunoștința mea pentru ospitalitatea și deosebita voastră amabilitate infinită.
Fie ca aceasta să fie prima sclipire a unei stele strălucitoare.

Gary Grotendorst
Institutele Naționale de Sănătăte, Bethesda, SUA
27 august 1983



Dragilor Maya și Nicolae,

Vă iubesc - pur și simplu - și vă doresc tot ce este mai bun din toata inima.
Vă mulțumesc foarte mult pentru aceste zile minunate.

Al vostru,
Gunter Blobel
Laureat al Premiului Nobel
Rockefeller University,
New York

Pentru Maya și Nicolae,

Aceasta va rămâne una din experiențele de neuitat din viața noastră. Ați realizat un lucru de invidiat, iar comunitatea științifică este mândră de voi. Vă urăm succes continuu.

Jane și Nick Kefalides

Dragă Nicolae și Maya,
La cea de a treia vizită a mea în institutul vostru dați-mi voie să-mi exprim sentimentele de admirație și minunare pentru ce ați realizat cu colegii voștri mai tineri. Entuziasmul și dăruirea voastră pentru munca științifică sunt o forță conducătoare pentru colegii voștri mai tineri. La aceasta a X-a aniversare vă urez un continuu succes.

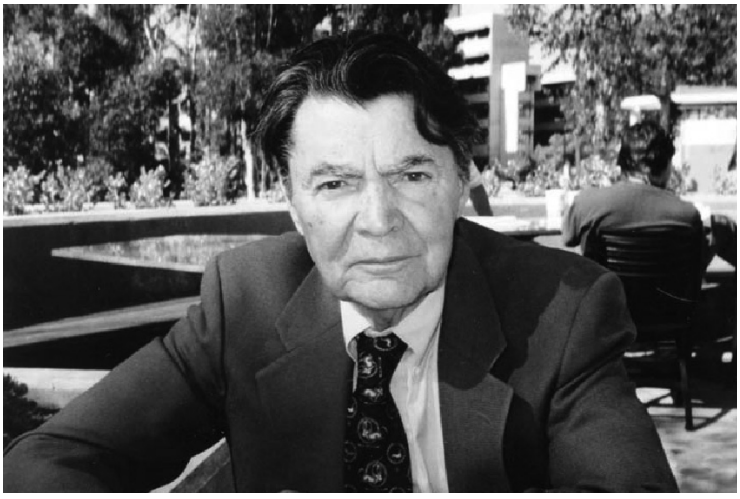
Cu toata dragostea și respectul meu,
Nick Kefalides
3 septembrie 1989

Maya și Nicolae,
Rar găsești doi oameni atât de plăcuți și de ospitalieri ca voi: doi oameni care au dăruit atât de mult din ei înșiși acestei formidabile realizări. Vizita noastră la Bucuresti și la Institutul de Biologie Celulară a fost o experiență valoroasă și atât Jane, cât și eu ne vom aminti întotdeauna de ea cu plăcere.

Nick Kefalides
Institutul pentru Studiul Țesutului Conjunctiv, Philadelphia, SUA
29 august 1983

Maya și Nicolae,
Vă știm de mult ca făcând parte din elita biologiei celulare – dar ceea ce ați făcut pentru omenire depășește cu mult granițele științei. Ați folosit celula pentru ca unul - și multe ale vise – să devină realitate sub numele de IBPC și ați fost inspirați să folosiți endoteliul ca o legătură între oameni. Într-adevăr voi v-ați dedicat viata chemării celei mai nobile – ați îmbunătățit calitatea vieții pe mica noastră planetă.

Guido Majno și Isabelle Jorris
Universitatea din Massachusetts, SUA
27 august 1983



Cu această ocazie fericită, cea de-a 20-a Aniversare a Institutului de Biologie și Patologie Celulară (IBPC) din București, doresc să felicit conducerea Institutului, cercetătorii ştiinţifici și întregul personal pentru performanţele remarcabile realizate. De-a lungul ultimilor ani, Institutul a devenit mai puternic decât înaintea schimbărilor politice care au fost în România cu 10 ani în urmă. Institutul a supravieţuit exodului unora din prima generație din cercetătorii pe care i-a format. Și, din nou, Institutul a supravieţuit dispariției fondatorului său, Nicolae Simionescu, al cărui nume îl poartă azi. Cu trecerea timpului, Institutul a dobândit o viață proprie bazată pe realizările sale trecute și actuale.

Condus de Maya Simionescu, asistată de colegii săi maturi și tineri, Institutul rămâne un centru important al cercetării biomedicale din România și un membru respectat al comunității ştiinţifice internaționale. Mai mult, Institutul promite să-și mențină poziția proeminentă actuală pentru mulți ani de acum înainte. Doresc să-mi exprim admirația pentru perseverența hotărâtoare de a lucra în Institut în timpuri grele și rămân al Dumneavoastră cu multă afecțiune.

Prof. George E. Palade
University of California, San Diego, SUA
1999

Draga Maya Simionescu,

Felicitări cu ocazia Aniversarii a douăzeci de ani de la înființarea Institutului!
Este greu de crezut că au trecut douăzeci de ani de când ne-am întâlnit la București, la Simpozionul inaugural al Institutului. Înființarea Institutului a fost ea însăși un eveniment remarcabil, ținând cont de circumstanțele politice dificile din acel timp. Pe scurt, a fost un miracol. Dar, un miracol mai mare a fost faptul că Institutul a supraviețuit și a prosperat în timp, având nenumărate contribuții în înțelegerea patologiei celulei, în special în domeniul mecanismelor bolilor cardiovasculare.
Mai mult, când Institutul a fost inaugurat, a fost gândit, de tine și de Nicolae Simionescu, ca un centru pentru competiție științifică, în care tinerii cercetători români să se specializeze la cel mai înalt nivel în domeniul Biologiei și Patologiei Celulare. Un alt record, de care, în mod justificat puteți fi mândri, și o altă vie contribuție a Institutului la viața științifică națională și internațională, sunt numeroșii tineri cercetători remarcabili, pe care i-ați format și pe care îi mai formați încă.
Eu sper ca următorii douăzeci de ani vă vor aduce chiar mai multe succese decât primii douăzeci. La mulți ani!

Prof. Marilyn G. Farquhar
Sef de Catedră la Departamentul de Medicină Celulară și Moleculară, University of California, San Diego, SUA

***

Dragi prieteni din București,

Îmi amintesc foarte bine Sesiunea Științifică din Institut, care a avut loc cu ani în urmă. Profesorii Simionescu au fost gazde excelente, nivelul științific a fost excelent, dar pentru mine aspectul cel mai interesant a fost întâlnirea cu tinerii cercetători ai Institutului. Entuziasmul, energia și pasiunea lor pentru știință a fost extraordinară. Cu toate adversitățile timpului, realizările lor au fost memorabile. Și, înfruntând toate dificultățile, Maya și Nicolae au direcționat proiectele științifice cu inteligență și inspirație, dar și cu eleganță și jovialitate, fiind un exemplu pentru fiecare din noi.
Institutul s-a dezvoltat și a prosperat în vremuri grele și în vremuri mai bune și azi este Centru de Excelență alături de alte onoruri primite.
La mulți ani la a 25-a aniversare! Să trăiți și să înfloriți!

Toate cele bune.
Cu amintiri frumoase,
Prof. Morris Karnovsky

AMINTIRI CU MAYA ŞI NICOLAE SIMIONESCU

Aniversarea a 25 de ani de la creerea Institutului de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu" este un moment important în istoria ştiinţei din România, şi din fericire, şi din cea a Revoluţiei române. Creerea acestui Institut ilustrează foarte bine ceea ce poate oferi mai bun poporul român: tenacitate, curaj, optimism şi creativitate.

Îi cunosc pe cei doi Simionescu de aproape o jumătate de secol. Maya a fost colega mea de facultate la Universitatea din Bucureşti, şi, la fel ca mine a fost victimizată la sfârşitul anilor '50, când guvernul a decis că familiile noastre sunt duşmani politici. Anii de persecuţii au continuat dar, în final noi am absolvit facultatea şi ne-am făcut carierele ştiinţifice.

Când Nicolae Simionescu s-a îndrăgostit de Maya, el era deja cercetător la Institutul de Endocrinologie şi era un nume respectat atât de comunitatea ştiinţifică română cât şi internaţională. Maya era o absolventă strălucită, dornică să înveţe cât mai mult în ştiinţă. Apoi, Profesorul George Palade Laureat al Premiului Nobel, i-a invitat să lucreze cu el la Universitatea Rockefeller din New York. Acolo i-am reîntâlnit în 1969.

Realizările şi viaţa lor împreună este o poveste romantică minunată nu numai pentru ce înseamnă dragoste, dar şi pentru dedicaţia lor pentru ştiinţa şi pentru viitorul ştiinţei în România, pentru că în acele timpuri ştiinţa nu avea nici un viitor la noi. Am venit in America prin câştigarea unei burse Roosevelt, iar soţul meu a sosit după un an. Am lăsat în urma noastră în ţară copiii, părinţii noştri şi toţi ceilalţi prieteni şi membrii de familie. În faţa noastră, în America am avut de surmontat dificultăţi, au fost lacrimi şi mult efort în anii ce au urmat, dar din primul moment am simţit că numai în America şi din America ne putem ajuta familiile să trăiască o viaţă decentă. Am discutat opţiunile noastre cu cei doi Simionescu. Ei îşi dădeau seama de lupta imposibilă pentru ştiinţa şi o viaţă decentă în România. Soţii Simionescu au avut nenumărate ocazii de a rămâne ca profesori în SUA în oricare din universităţile de elită de acolo. Au lucrat la Universităţile Rockefeller, Yale şi Columbia aducând contribuţii esenţiale la înţelegerea mecanismelor de funcţionare ale celulei endoteliale în condiţii normale şi patologice. Cercetările lor sunt esenţiale pentru progresele în introducerea de noi terapii pentru nenumărate maladii care implică modificări de tip inflamatoriu în celulele endoteliale. Lucrările publicate de ei în reviste de specialitate de renume sunt azi clasice pentru biologia celulară.

Aceste lucruri au fost apreciate în SUA, Profesorii Simionescu fiind ani la rând Profesori-invitați și realizând cercetări împreună cu colegii americani cu cele mai avansate tehnologii de investigare în biologia celulară. Conștienți de faptul că aceste tehnologii nu erau disponibile în România, ei au decis să caute fonduri pentru echiparea laboratoarelor și să clădească Institutul de Biologie Celulară pe care-l visau. Renumele lor în SUA a fost atât de prestigios încât au obținut burse pentru cercetători în scopul de a studia și a lucra în proiectele inițiate de Profesorii Simionescu în laboratoarele americane. Și apoi, cercetătorii au primit oferte pe care nu le puteau refuza: poziție, salariu bun și o viață mai bună în America.

Promisiuni care nu s-au ținut și mari probleme financiare au fost numai o parte din prețul plătit pentru a duce știința înapoi în România și pentru a creea Institutul. Final, în aceasta luptă a cedat și inima lui Nicolae Simionescu. Faima și reputația nu i-au cruțat inima, astfel încât el a plătit ultimul preț, viața sa. Maya a rămas pentru a continua lucrarea monumentală și a trece peste acestă durere. Curajul și l-a găsit din dedicația pentru memoria soțului său. Ea a continuat să facă studii eminente, unele chiar de pionierat, să publice în cele mai reputate reviste de specialitate și să competiționeze cu laboratoare de vârf din SUA și din Europa de vest.

Institutul de Biologie și Patologie Celulară ”Nicolae Simionescu” nu numai a supraviețuit, dar a devenit un Institut de prim rang. Adresa sa este: București, România nu București, Ungaria așa cum era scris pe cererile de extrase de pe lucrările mele din Nature până în 1969, când am plecat. Și astfel, istoria Institutului este o poveste minunată despre triumful dragostei și al științei asupra vicisitudinilor.

Colegi români, nu credeți că povestea lui Nicolae Simionescu și a Institutului său seamănă cu cea a Meșterului Manole? Povestiți-o vizitatorilor dumneavostră de peste hotare pentru ca ei poate vor auzi vocile care vin din pereții monumentelor noastre.

Prof. Nicole Suciu-Foca
Universitatea Columbia, New York, NY, SUA

Totdeauna trebuie să vă amintiți cât de mult depinde totul de calitatea muncii voastre. Pentru ceea ce ați facut deja aveți admirația mea deplină; pentru viitor aveți urările mele cele mai bune.

George E. Palade
Laureat al Premiului Nobel
Universitatea Yale, New Haven, SUA
29 august 1983

Pentru toți membrii institutului – multumiri pline de recunoștința pentru splendida voastră ospitalitate. Am fost foarte impresionată de progresele voastre științifice remarcabile înregistrate de la prima mea vizită, acum patru ani. Perseverați în muncă, nu vă pierdeți entuziasmul pentru că în mod cert dă rezultate.

Încă o dată, mulțumirile și admirația mea.

Marilyn Farquhar
Universitatea Yale, New Haven, SUA
27 august 1983

Către toți prietenii mei, foarte vechi, nu atât de vechi și foarte tineri din IBPC:
Puteți fi încântați și mândri de ce ați realizat în zece ani în condiții mai curând dificile. Climatul din jurul nostru se schimba. Există bune motive să credem într-un viitor – foarte apropiat – mai deschis și care să aprecieze mai mult ceea ce oamenii onești pot face în domeniul promițător în care lucrați voi. Asta înseamnă că următorii zece ani vor putea fi de asemenea memorabili. E timpul să păstrați încrederea și să mergeți inainte.

George E. Palade
Laureat al Premiului Nobel pentru Medicină și Fiziologie
Profesor Emerit al Universității Yale, SUA
3 septembrie 1989

Sunt plin de admirație pentru efortul vostru extraordinar și plin de succes de a crea o insulă de excelență științifică în România. Dezvoltarea absolut necesară a științei – atât ca valoare etică, morală, cât și culturală – și datorită importanței sale pentru progresul național – poate începe exclusiv prin tipul de Institut pe care l-ați creat. Venind din Israel, cu multe lupte interne, pot înțelege posibilele voastre momente de frustrare, dar sunt total convins că voi și colegii vostri din institut veți avea un total succes pentru binele țării voastre și a întregii umanități.

Cu cele mai calde urări,

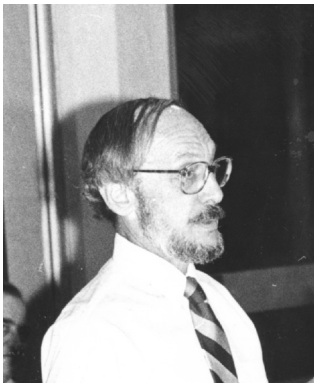
Prof. Michael Sela
Departament Imunologie,
Institutul Weizmann, Israel
7 martie 1991

Nicolai și Maya,

Calitatea vizitei contează, nu perioada de timp. Calitatea a fost excepțională, ospitalitatea și primirea foarte călduroase. Amândoi sunteți din multe puncte de vedere "părinții spirituali" ai muncii mele științifice – a fost o mare și plăcută ocazie pentru mine să discut rezultatele muncii mele cu voi și cu impresionantul vostru personal de cercetare.

Judson Sheridan
Universitatea din Minneapolis, SUA
10 aprilie 1981

Dragi prieteni,
A fost o mare plăcere pentru mine să pot fi alături de voi la cea de a X-a aniversare a institutului, să vă cunosc pe toți și să gustăm împreună din bucuria care se emană din știința de bună calitate, din discuții deschise și din entuziasmul sincer pentru celule și biologie. Ați fost cele mai bune și generoase gazde. Ați stabilit un standard foarte înalt atât în știință, cât și în omenie.
Vă urez toate cele bune pentru un succes continuu în tot ce veți face, atât personal, cât și profesional.
Sam Silverstein



Unele întruniri științifice sunt simple întâlniri de afaceri, dar aceasta a emanat căldură, generozitate, prietenie și ȘTIINȚĂ ADEVĂRATĂ.

Multumesc,
Dan Steinberg

MĂRTURIE PENTRU UN VIS DEVENIT REALITATE: INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ "ACAD. PROF. DR. NICOLAE SIMIONESCU"

1979. Într-o dimineață, pe o vreme plumburie ca și vremurile de atunci, Dr. Constantin Velican mi-a spus: "Vino să-ți arăt cum se înfiripă un miracol!". Cu scepticismul celui care, de la Eminescu citire, știa că "minuni în vremea noastră nu cred a se mai face", am ajuns în Str. B. P. Hașdeu, la nr. 8.

O clădire mare, aparent impersonală, în care, pe culoare și pe scări erau grămezi de moloz și, ca într-un joc al umbrelor, era un du-te - vino de lucrători, cu saci de nisip în spate și cutii de vopsele în mâini. Într-o cameră mică, în semiobscuritate, printre lăzi și cutii nedespachetate, ne-a întâmpinat Dr. Neacșu, care a pus pe o măsuță un sul de hârtie grosieră și ușor cafenie. Părea că provine de la ambalajul unui aparat.

Dupa câteva minute, sulul de hârtie desfășurat s-a însuflețit și au început să apară linii, schițe, notițe, scrise în toate sensurile. Ni s-a spus: "Acestea sunt planurile trimise de Prof. Nicolae Simionescu și Maya, pentru viitorul Institut de Biologie și Patologie Celulara". Brusc, camera parcă s-a luminat și, undeva, departe, am văzut cu ochii minții silueta unui edificiu și a unei instituții moderne, dedicată cercetării științifice, așa cum visam cu toți.

Au trecut ani și prin eforturile uneori sisifice, ale fondatorilor, Institutul a prins viața. Aparatura de înaltă tehnicitate și-a găsit locul în camerele, acum luminoase și vesele că sunt "locuite" de tineri, recrutați dintre cei mai buni absolvenți ai Facultăților de Biologie, Biochimie, Fizică ș.a. Trimiși la specializare în institute și centre de cercetare renumite din toată lumea, acești a se întorceau acasă pentru a contribui la dezvoltarea științei românești.

În amfiteatrul cu scaune tapisate într-un galben luminos, dătător de speranțe, s-au perindat figuri ilustre ale comunității științifice internaționale, unele purtând aura premiilor Nobel. Au putut fi audiate prelegeri și cursuri, lucrări, prezentate de Profesorii George Emil Palade, Christian de Duve, Guido Majno, Isabel Joris ș.a.

Conferințele internationale organizate cu periodicitate regulată, Sesiunile Anuale ale Institutului au fost adevărate sărbători care au reușit să pună în vibrație comună pe cei din afară cu cei din țară.

Dorind să formeze "creatori de știință, sensibilizati și fertilizați prin cultură" (cuvântul Acad. Nicolae Simionescu la comemorarea lui Eminescu în 1989), Profesorii Nicolae și Maya Simionescu au ținut strânsă echipa institutului și pe prietenii lor și cu prilejul aniversărilor culturale, al sărbătorilor naționale și personale.

…Dar, "mult prea repede trecătorul timp" nu iartă. Barca institutului, care

înainta cu vântul în pânze, a pierdut unul din cei doi timonieri. Cel rămas, Acad. Maya Simionescu, păstrând durerea pentru sine, și-a strâns puterile și a tinut ferm și drept drumul institutului.

Hans Selye spunea: "Pentru a face un vis frumos să devină realitate, prima condiție este aceea de a avea o mare capacitate de a visa; a doua este perseverența, adică încrederea în vis".

Institutul de Biologie și Patologie Celulară "N. Simionescu" a avut șansa ca fondatorii săi să-i așeze la temelie aceste două prețioase pietre.

"La mulți, mulți ani !"

Dr. Doina Velican
Membru al Academiei de Științe Medicale

***

CLIPE DE VIAȚĂ

Institutul nostru împlinește douăzeci și cinci de ani!

Acest loc a reprezentat și reprezintă "o instituție de cultură în care se face știință", așa cum preciza cel al cărui nume este intrinsec legat de Institutul de Biologie și Patologie Celulară, Profesorul Nicolae Simionescu. Institutul a fost și este un act de patriotism real împlinit prin prestigiul științific, dăruirea și entuziasmul fără limite al fondatorilor săi, Profesorii Nicolae și Maya Simionescu. Totodată, Institutul este o școală modernă de instruire avansată a tineretului și specialiștilor în biologie și patologie celulară; numeroși studenți, masteranzi și absolvenți (din țară, SUA și Spania) și-au efectuat tezele în laboratoarele noastre, inclusiv tezele de doctorat în biologie celulară.
Institutul a fost și un loc de refugiu în fața problemelor vieții de zi cu zi, în timpuri grele, când în liniștea și calmul laboratoarelor ne concentram asupra experimentelor menite să descifreze mecanismele implicate în funcționarea endoteliului vascular în condiții fiziologice, iar pe ecranul microscopului electronic observăm căile de transport operante în celulele peretelui vascular și încercăm să înțelegem modificările apărute odată cu instalarea patologiilor cardiovasculare. Așteptam cu neliniște să vedem cum "au ieșit" gelurile, transferurile, radiomarcările, fotografiile de microscopie, etc. și ne desprindeam de mediul înconjurator într-o oază aducătoare de satisfacții științifice și cu potențial de întelegere și apoi de redresare al maladiilor cardiovasculare atât de frecvente în populația afectată de stress.
Institutul a fost, este și va fi o șansa de realizare profesională pentru fiecare. Am competiționat la selecția de candidați pentru specializare în biologie celulară realizată de Profesorul Nicolae Simionescu înainte de înființarea Institutului și am avut șansa de a fi selectată ca bursier Fullbright. Universitatea din New York, Departamentul de Biologie Celulară a fost locul ideal ales de Domnul Profesor, pentru a-mi însuși metodologia, sistemul de lucru, stilul de seminarii, etc în vederea îndatoririlor mele

odată cu deschiderea Institutului.
Mă văd păşind pentru prima oară în clădirea din Str. Haşdeu nr. 8; era încă şantier, cu... 13 persoane angajate înaintea mea. Domnul Profesor mă primeşte în birou şi-mi spune să mă instalez la etajul II în laboratorul mare, de care urmează să mă ocup. Urc scările şi descopăr etajul cu faianţa bleu, intru în toate laboratoarele cu ferestre şi podele încă pline de var şi aleg care este laboratorul cel mai mare. Dar, nu sunt sigură că am nimerit bine şi... mai urc un etaj. Nimeni în jur. Descopăr faianţa vernil peste tot, dar niciun laborator nu este de mărimea celui anterior stabilit. Deci, la etajul II îmi este locul! Ce voi urma să fac aici: organizarea laboratorului de biochimie preparativă, supravegherea funcţionării optime a scintilatoarelor, ultracentrifugilor, susţinerea de seminarii metodologice, etc.
Primul an, primele seminarii. Pregătim scurte rapoarte asupra progreselor temei fiecăruia. Ne străduim să fie cât mai temeinic fundamentate în contextul literaturii şi susţinute de rezultatele obţinute; discuţiile sunt conduse de Domnul Profesor şi orientate cu precădere spre sublinierea elementelor de noutate şi a direcţiilor imediate de cercetare. Domnul Profesor cunoştea perfect literatura, în cel mai mic detaliu, inclusiv numele autorilor, avea un talent desăvârşit în moderarea discutiilor (unele foarte aprinse) şi stârnea curiozitatea ca nimeni altul...Plecam din seminarii cu dorinţa ca noaptea să treacă cât mai repede, iar a doua zi să încerc să experimentez ideile care mi-au fost sugerate sau observaţiile făcute.
O împrejurare, o metodă de lucru care azi nu mai este "en-vogue", dar de care este absolută nevoie, un caiet vechi de lucru, un anume ac-fluturaş din trusa de micro-chirurgie, etc. mă fac să-mi aduc aminte de clipe trecute şi să le povestesc apoi tinerelor mele colaboratoare.
Este iarna şi aproape 9 seara, afară ninge cu fulgi mari; la sala de operaţie Doamna Maya ne învăţa cum să perfuzăm plămânul unui şobolan şi să-i îndepărtam sângele cu soluţie tampon cât timp animalul respiră încă; reuşita nu este perfectă, fie plămânul rămane "roz", fie spargem bariera sânge-aer şi în plămân se formează edeme. În disperare, Doamna Geogescu (tehnician de la biobază) ne atenţionează că nu mai putem să tot încercăm - avem în mână "ultimul şobolan", ultima şansă... De atunci s-au perindat mulţi şoareci şi hamsteri pe masa noastră de microchirurgie, iar plămânul a fost perfuzat cu succes. Studiile "in situ" asupra căilor de transport ale albuminei (glicată reversibil sau ireversibil) în endoteliul capilar pulmonar şi modificările acestui pat vascular în diabetul (experimental) au fost publicate în reviste prestigioase din străinatate şi în monografii internaţionale.
Alte amintiri... Nicu vrea să izoleze peroxidaza din hrean. Se cumpără hreanul, Marcela îl curaţă cu şiruri bogate de lacrimi şi se începe mărunţirea lui cu tocătorul de la "Cafeterie". De atâta tocat, maşina se încălzeşte peste măsură, i se rupe cuţitul şi final, coada... spre hazul nostru general...
Virgil apare în uşă "office"-ului meu cu un ochi vânăt, reclamând că l-a lovit Doctorul Neacşu! Eu nu cred în ruptul capului şi, după argumente pro şi contra, recunoaste că a fost o glumă... proastă şi că s-a vopsit singur cu cerneală ca să mă sperie!

Și, tot iarna, la Pomul de Crăciun, prima întâlnire cu copiii colaboratorilor... fascinați mai puțin de barba de vată a lui "Moș Gerilă", cât de scaunele noastre cu rotile, pe care le împing pe toata lungimea laboratorului și de scaunele cu șurub, înălțate până la limita periculoasă a deșurubării complete.

Doi iunie 1982, este data înființării Societății Naționale de Biologie Celulară (SNBC), o altă inițativă a Profesorului Nicolae Simionescu. Societatea (afiliată la cea Europeană) a avut și are drept scop promovarea progreselor științifice în domeniul biologiei celulare și moleculare, normale și patologice, organizarea și dezvoltarea în țara noastră a cooperării multidisciplinare specifice acestui domeniu, sprijinirea cercetăilor fundamentale, de largă perspectivă. A fost nu numai o cinste, dar și o mare bucurie să îndeplinesc funcția de Secretar al SNBC timp de... 12 ani. Și acum, după 22 de ani, colaboratorii mei de la filiale mi-au devenit buni prieteni, unii chiar colaboratori.

Anii '85-86: ne mutăm cu laboratorul la parter. Aici este mai însorit și laboratorul mai mic. Se produce prima rocadă, locul lui Șerban, Monica și Rozi este luat de Nicu, Mircea, Junona și Mirela. Din când în când, Domnul Profesor lucrează în "office"-ul alăturat, unde este soare în zilele senine. Trebuie să fim atenți să nu râdem prea tare și să-l deranjăm; dar, de fapt, profităm de dânsul, batem la ușă și-i întrerupem (nepoliticos) gândul cu de-ale noastre...

Discuțiile cu caietul de experimente în față ghidate cu infinită răbdare și exigență competentă de Doamna Maya oferă alternative de urmat, soluții eficiente, realizează un adevarat "brain storming" și oferă o satisfacție intelectuală aparte, la fel ca și azi.

Este din ce în ce mai frig în Institut. Lucrăm acum îmbrăcați cu costumele de ski destinate inițial folosirii în camerele reci. Soluțiile de detergenți pentru electroforeză sedimentează; căutam alternative de reactivi stabili la temperaturi în jur de 100 C. Dilema însă persistă pentru că rezultatele din literatură sunt raportate la "temperatura camerei", care cert este peste cea din jurul nostru... însă, Junona calmă își pune la picioare un resou adus de acasă și, cu căștile la urechi își perfecționează impasibilă... limba engleză.

Tot în anii '85-86, este august și noaptea se produce un cutremur. Telefoanele sunt întrerupte, pe străzi este un haos de mașini și oameni. Pornesc pe jos în viteză spre Institut și desfășor în minte scenarii care de care mai teribile. La Institut, calm... cele câteva cioburi de la cilindrii le măturase deja Relu.

Anii '90. Se fac interview-uri pentru noi angajări. S-au înscris deja 17 persoane, dar... la interview descopăr după lungi căutari una singură, o tânară mignonă, cu aspect de fetiță speriată, îmbrăcată în roz. Este Gabi, cea care va face o impresie deosebită, va fi angajată și este azi Doctor în biologie celulară și unul din pilonii generației următoare a Institutului.

Se produce un alt cutremur, de astă dată în cursul zilei: Nona iese speriată de la microscopul electronic, eu fug în curte, etc. Numai Domnul Profesor rămâne în biroul său și... dă telefoane familiilor noastre, asigurându-le că totul este în regulă: Institutul rezistă, noi suntem bine... așa cum este și azi, dar numai Dânsul nu mai este... Sunt sigură însă că a rămas în biroul său, cu toate cutremurele mai mari sau mai mici și încă

lucrează spre binele nostru.
Urmează o a doua rocadă; locurile de la mesele de lucru sunt acum ocupate de Adriana, Alina, Gabi și... de computer, iar alte două noi locuri de Nicoleta și Mădălina. Ele sunt schimbul nostru, generația ce formează azi peste 30% din cercetătorii Institutului. Dar, cum vedeți, sunt numai fete... iar când vreun dop se încăpățânează să iasă, colegele mele insistă să mai vina și o mână bărbătească alături... Acum sunt alte aparate la concurență acerbă - termocycler-ul PCR, aparatul de RT-PCR, microscopul inversat computerizat, miograful... se fac programări cum se făceau înainte la "tăiere la microtom" și la microscopul elecronic! Alți actori (cercetători), aceeași scenă (Institutul), ducând mai departe făclia pe care ne-au îndemnat să o purtăm cu seriozitate, rigurozitate și nesfârșită dăruire Domnul Profesor și Doamna Maya.
Când scriu aceste rânduri este primavară (iar). Un pițigoi cu penej albastru superb vizitează mugurii corcodușului de la geamul "office"-ului meu. Din când în când vine și pe pervazul ferestrei. Se uită poate la florile albe primite la ziua mea și care au făcut rădăcini în Berzelius-ul în care le-am pus. Le plantez afară în grădină. Știți unde? într-unul din "coated-pits" de lângă buturugile-scaunele. Sunt sigură că vor înflori și la anul! La mulți ani I.B.P.C.!

Dr. Doina Popov
Membru corespondent al Academiei Române

***

LECȚIILE D-LUI PROFESOR

Aduceri aminte și reflecții. Imagini persistente în memorie. Gânduri care recompun perioada de început, dominată de personalitatea d-lui Profesor Nicolae Simionescu. Au fost „LECȚIILE D-LUI PROFESOR".

NAȘTEREA UNUI CERCETĂTOR - ATRIBUIREA TEMEI DE CERCETARE

Noul venit trece printr-o perioadă de probă de 6 luni și se familiarizează cu tehnicile și temele din toate laboratoarele Institutului. Apoi, «marele moment»: fiecare dintre noi este chemat la D-l Profesor care decide laboratorul unde ești repartizat, colegul cu experiență cu care vei lucra și, poate cel mai important lucru, tema proiectului pe care urma să îl realizezi.
Tema mea se intitula «Izolare, cultivare și metabolism al celulelor endocardice». Entuziasm, dar și putină teamă. Știam că acest tip de celule nu mai fuseseră cultivate, exista puțină literatură în domeniu și trebuia multă muncă și imaginație pentru a realiza proiectul. D-l Profesor a stabilit câteva puncte de plecare, idei despre modul în care puteam să abordez subiectul. Am pornit la drum cu încredere și nerăbdare la ideea «minunilor» pe care urma să le descopar.
Pentru mine, ca și pentru mulți dintre noi, Institutul a început să devină un mod de viață. Ne-am maturizat o dată cu Institutul și am contribuit la evoluția Institutului.

PRIMII PAȘI AI UNUI CERCETĂTOR – SEMINARIILE ȘTIINȚIFICE

Trimestrial, fiecare dintre noi trebuie să prezinte un raport de cercetare în cadrul unui seminar științific. Raportul urmează să fie „validat" de colegi și, cel mai important lucru, de către D-l Profesor. Seminariile sunt adevărate lecții privind modul de prezentare a rezultatelor cercetărilor noastre. Toți ne străduim să le pregătim cât mai bine ca să putem face fața întrebărilor colegilor și, bineînțeles, ale D-lui Profesor. Întrebările D-lui Profesor le aștepți cu neliniște. Ele te aduc la limita de cunoaștere la care ești și pe care trebuie să o depășești, te fac conștient de locul tău, în acel moment, în evoluția științei.

La finalul fiecărei prezentări, D-l Profesor ține o lecție de biologie celulară în care integrează rezultatele prezentate și evidențiază posibile dezvoltări ale proiectului. Definește drumul pe care trebuie să mergem în continuare și ne arată perspectivele pe care, fiind la început de drum, noi nu le întrevedem. Sugerează fiecăruia cum să continue proiectul și ce mai trebuie completat pentru ca în final să se poată realiza o lucrare științifică valoroasă.

Pentru unii dintre noi seminariile se termină în lacrimi sau revoltă atunci când nu putem să răspundem la câte o întrebare esențială pentru tema prezentată, întrebare care verifică în detaliu cunoașterea „obiectului de studiu". Indiferent de reacție, în final fiecare realizează că D-l Profesor are dreptate.

MATURITATEA UNUI CERCETĂTOR – LUCRĂRILE ȘTIINȚIFICE

Orice material științific trece pe la D-l Profesor. Este analizat la „sânge" și noi așteptăm rezultatul cu nerăbdare. Profesorul impune anumite standarde care treptat devin obișnuință. Ne obligă continuu să ne documentăm cât mai mult, să ne „gândim" experimentele cât mai profund, să le înțelegem cât mai bine, să lucrăm cât mai corect, să fim cât mai onești în interpretarea rezultatelor, să fim decenți în prezentarea concluziilor lucrărilor noastre, să integrăm rezultatele în teorii generale și să continuăm drumul pe căile cele mai potrivite.

Lecțiile D-lui Profesor sunt aprofundate cu fiecare „eveniment" trăit de noi în Institut: discuțiile despre temele de cercetare și lucrările ce urmau să fie publicate sau prezentate, rapoartele de cercetare trimestriale, examenele, sesiunile științifice naționale și internaționale. Cu timpul, pregătirea noastră științifică ne-a ajutat să fim mai aproape de statutul unui cercetător de valoare, așa cum Dl Profesor ne dorea să fim.

Gândindu-mă la „Lecțiile D-lui Profesor" înțeleg mai bine ceea ce spunea Albert Einstein: „Lucrul cel mai minunat cu care ne putem întâlni este misterul. La baza artei și științei adevărate se află emoția primară. Cel care nu știe acest lucru și nu mai poate fi curios sau simți uimire este ca și mort, asemenea unei lumânări stinse". Realizez că aceste cuvinte exprimă foarte bine ceea ce gândea și încerca să ne transmită și nouă D-l Profesor, care, cu toată forța personalității sale a reușit să ne facă să existăm în știință și în viață asemeni unor lumânări aprinse, uimiți și curioși la „minunile lumii în care trăim", dornici să-i descifrăm misterele cu mintea și sufletul. A făcut acest lucru

demonstrându-ne prin propriul exemplu că se poate, mobilizându-ne cu o tinerețe și o energie inepuizabile să ne depășim limitele, să aspirăm către mai mult și mai bine, să încercăm să ne apropiem de standardele înalte pe care le impunea D-l Profesor.
După trecerea în neființă a D-lui Profesor, Institutul de Biologie și Patologie Celulară a devenit Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu". Acum Institutul este condus cu succes de cea care i-a fost mereu alături în știință și în viață, D-na Maya Simionescu. Sub coordonarea Dnei Maya am fost selectați, prin competiție, Centru de Excelență al Comunității Europene. Continuăm drumul în spiritul a ceea ce deseori spunea D-l Profesor: „Nu se poate construi nimic durabil, dacă în materialul de construcție nu este adăugat «quatum satis», suflet. Fără dăruire nu poți deveni niciodată ceea ce admiri".

Dr. Ileana Mânduțeanu

***

Nu avem norocul să fim prezenți (fizic) la a 20-a aniversare a Institutului. N-am avut șansa să fim nici la fastuoasa Inaugurare de acum douăzeci de ani. Dar am avut norocul să recităm elegii la împlinirea primăvăraticei vârste de 5 ani și să participăm la a 10-a aniversare, încrustată în sclipirea de fulger a unui diamant.
Am știut oare atunci la ce evenimente asistăm? Aveam cu siguranță intuiția că se întâmpla ceva deosebit. Și, într-adevăr, în acei ani se întâmpla ceva unic. Toate erau evenimente, adevăratele evenimente ale vieții noastre și ale științei românești: și conferințele internationale, și sesiunile SNBC, și seminariile din IBPC. Și pluguşoarele, și excursiile, și plecările, și venirile Dvs. din străinătate.
Pe plan personal, tot evenimente au fost și șansa de a fi contemporani cu Institutul, de a fi acceptați în procesul de selecție, și aceea de a putea fi angajați în IBPC în acele vremuri tulburi. Sau de a ne mândri cu câte un "abstract" la sesiunile din septembrie, iar mai târziu, cu câte o lucrare pe care am avut onoarea ca și Dl. Profesor să-și pună semnătura.
Pe atunci, chiar a ne întâlni cu Domnul Profesor pe coridor era un eveniment...! Sau de a vă vedea mașina în curte, pe geamul laboratorului de la parter... Sau aceea de a răsfoi, din întâmplare, la sala de consiliu, lucrările Profesorului din tinerețe, sau note din perioada de la Endocrinologie.
Aveam atunci, atât admirația discipolilor care încearcă să înțeleagă secretul devenirii unei celebrități și să "fure" ceva din componența magică a Maestrului, dar și jena comiterii unei vagi indiscreții... Oricum, psihanaliza ar putea explica multe din elanurile noastre de atunci și mai ales încăpățânările și ratările multora dintre noi, care ne concuram în a căpăta atenția și aprecierea "tatălui". Ce naivi eram! Abia acum, când noi înșine suntem părinți, înțelegem că ne iubea pe toți, chiar atunci când ne arăta bățul...

Profesorul a fost el însusi un Eveniment, o apariție singulară în istorie.
El singur a avut puterea să-i contrazică pe marxiști la ei acasă: nu masele amorfe fac Istoria, ci personalitățile. Fie că ele se numeau, așa cum ne-a învățat aniversând chiar în școala de Biologie Celulară de pe chei, pe Eminescu, pe Iorga, pe Brâncuși, fie că erau Palade sau... Simionescu.
Azi, a fi fost „from Simionescu's Institute" e un pașaport transatlantic.
Dacă peste încă zece, cincizeci, sau o sută de ani va mai ști cineva din lume unde este București-ul pe hartă (fie ea și harta științei), asta va datora mult Institutului, Domnului Profesor și Dumneavoastră.
Obosit de o lume prea mică pentru el, Profesorul se odihnește la temelia Institutului.

Veșnică recunoștință Domnule Profesor...
La mulți ani, IBPC!

Nicanor și Leni Moldovan
Heart and Lung Institute, University Medical Center,
Ohio State University, Columbus, USA
1999

***

ÎNCEPUTURI

Nu avusesem până atunci un MENTOR. Până în ziua de 26 mai 1979 când am intrat prima oară, cu emoții și speranțe, în cabinetul PROFESORULUI. Nu știam că în acea zi, când mi-a fost acceptată intrarea în Institut, va începe creșterea mea - profesională, umană, morală. Am simțit însă foarte curând că uriașa personalitate, blândă și exigentă, de o statură științifică impresionantă, mă va determina să rămân definitiv legată de Institut.
Cu o forță de granit, neînduplecat, luptându-se cu toate cozile de topor, construia, crea, plămădea Institutul sub ochii noștri. Nu i-a fost ușor. Nici nouă. Dar această "AVENTURĂ" a creat miracolul. Îi invidiez puțin pe cei tineri care au găsit aici o instituție matură, cu un solidificat prestigiu național și internațional. Dar am totodată și o ușoară părere de rău pentru ei, pentru că nu au participat la ÎNCEPUTURI. Nimic nu se compară cu începuturile. În bezna dictatorială de atunci, veneam la Institut ca fluturii spre lumină. Uitam să mai plecăm, angajându-ne în dispute aprige în timpul seminariilor, până la 8-9 seara. Rămâneam în Institut nopțile dinaintea sesiunilor științifice. Bântuiam pe coridoare și prin laboratoare, mânjiți de lipici, certându-ne pentru o bucată de carton și radiind de fericire la fiecare poster terminat. Totul trebuia să fie perfect, nici o literă strâmbă, nici un colț dezlipit. Nu pentru alții, pentru noi. Am învățat asta. Ne strângeam grămadă în jurul meselor de la bibliotecă și făceam claca la alegerea literelor de plastic pentru titlurile de la postere. În unele duminici ne căram și copiii după noi. Fetița mea de 5 ani se rătăcise într-o zi pe coridoare. "Unde

te duci, Diana?" "Mă duc... la familia aceea de la bibliotecă..."
Eram o FAMILIE. O familie mare, cu necazurile și bucuriile ei, cu lupta perseverentă pentru a putea exista, cu luminoasele ei satisfacții. De multe ori – puțini știu – ne-a fost amenințată existența. Capul familiei, PROFESORUL, a știut să lupte și să ne conducă spre realizări considerate atunci utopice, imposibile. Astăzi suntem un arbore cu rădăcinile bine înfipte în pământ. E greu să tai un arbore. E greu, e păcat și până la urmă inutil, pentru că rădăcinile bine înfipte în pământ dau întotdeauna lăstari și muguri primăvara.

Dr. Nona Constantinescu

***

Domnule Președinte al Academiei Române,
Stimați colegi,
Doamnelor și Domnilor,

Doresc, în primul rând, să vă mulțumesc pentru invitația ce mi-a fost adresată de a participa la Sesiunea Științifică Aniversară - Institutul de Biologie și Patologie Celulară "N. Simionescu" la 20 de ani - și să vă mărturisesc cât de bine mă simt astăzi și ori de câte ori, mă aflu în mijlocul acestui harnic colectiv care activează în Institut și care se bucură de un bine-meritat prestigiu în țară și peste hotare. Cu 20 de ani în urmă, Profesorul Nicolae Simionescu și soția sa Maya Simionescu, care visaseră demult un asemenea Institut, s-au străduit să transforme visul în realitate. Și nu le-a fost deloc ușor. Dar în cele din urmă au reușit, punând într-însul mult suflet. Suflet din sufletul lor. Din păcate soarta nemiloasă l-a răpit prematur pe distinsul Academician Nicolae Simionescu, pe atunci Vicepreședinte al Academiei Române și Director al Institutului, lăsând în urma lui un mare gol, greu de împlinit. Dar, potrivit cuvintelor lui Horațiu "Vasul păstreaza multă vreme mireasma de care s-a pătruns mai întâi", sperăm ca Institutul de Biologie și Patologie Celulară "N. Simionescu" să păstreze multă vreme mireasma spiritului marelui om de știință care a fost Nicolae Simionescu și al cărui nume îl poartă.
Acum 20 de ani, un vrednic colectiv, format din oameni de știință de o înaltă competență, cu o bogată experiență și din tineri entuziaști, dornici să se afirme, porneau împreună pe un drum nou, nebătătorit încă. Cele două generații au conlucrat excelent, într-un veritabil spirit de echipă. S-a lucrat mult. S-a lucrat cu pasiune și dăruire, de dimineața până seara, și adesea, până târziu în noapte. S-a lucrat cu plăcere și roadele n-au întârziat să se arate. În întâlniri internaționale de lucru, cercetătorii Institutului au putut constata cu satisfacție că pot purta discuții, practic, vorbind de la egal la egal, cu prestigioase personalități ale biologiei și patologiei celulare mondiale și că rezultatele obținute de ei prezentau interes pentru aceste presonalități, fapt care a avut un efect tonic. Le-a dat mai multă încredere în propriile lor forțe și curajul

necesar pentru a merge mai departe pe drumul atât de spinos, dar totuși atât de frumos, al cercetării științifice. Fără îndoială, meritul mare al Institutului este acela de a fi dat la iveală noi secrete ale naturii în domeniul biologiei și patologiei celulare, dar tot atât de important mi se pare și faptul că Institutul a devenit o școală în care se formează și se desăvârsesc noi specialiști în acest domeniu. Și când subliniez acest merit, îmi vine fără să vreau, în minte, un vechi proverb chinezesc, potrivit căruia "Dacă oferi unui om un pește el se va hrăni o dată, dar dacă îl înveți să pescuiască el se va hrăni întreaga viață".

În încheiere, vă rog să-mi permiteți să urez Doamnei Academician Maya Simionescu, Vicepreședinte al Academiei Române și Director al Institutului de Biologie și Patologie Celulară "N. Simionescu", precum și tuturor celor care activează în acest institut, sănătate deplină, tinerețe spirituală, noi și remarcabile succese în descoperirea secretelor vieții, în acestă dificilă, dar frumoasă confruntare cu necunoscutul. Fie ca, în spiritul celebrului vers al lui Horațiu "Exegi monumentum aere perennius" rezultatele cercetărilor Institutului să se impună și în viitor pe plan mondial, ca un impresionant monument de știință, în slujba omului, mai durabil decât bronzul.

Vivat, crescat, floreat
Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"!

Academician Radu Voinea
Președinte al Secției de Științe Tehnice al Academiei Române
1999

***

AȘA CUM A FOST

De regulă, luni dimineața, Domnul Profesor dorea să știe cam ce avem de lucru la grafică pentru săptămana în curs. După ce puneam "țara la cale", de la un timp mă întreba dacă am urmărit emisiunea de sâmbătă după amiază. Pentru mine acea emisiune era un regal al sufletului alături de Iosif Sava. Generosul amfitrion mă prindea în mrejele pasiunii lui pentru muzică și cultură. Mă capta cu entuziasmul lui mai ales atunci când aducea în fața telespectatorilor un tânăr pe care-l investiga cu cel mai iscusit talent. Se bucura sincer când descoperea în interlocutorul său o persoană care rezista "hărțuielilor". Se ambala, se entuziasma, uneori exagera, dar era totuși minunat și toată vibrația emoției lui trecea dincolo de ecran. Eu eram fascinată de acest magician. Domnul Profesor se amuza de impactul pe care-l avea asupra mea, mă tachina puțin, apoi plecam la treburile mele. O dată ieșită pe ușa cabinetului său, ziua de luni căpăta o anumita aură. Cred că pentru fiecare dintre noi Domnul Profesor avea un "buton de reglaj fin" cu care să te ajute să rezonezi cu ceea ce urma. Reușise să mă determine să-mi doresc să aflu cât mai multe despre ceea ce reprezentau diagramele sau fotografiile de microscopie unde evidențiam prin diferite semne si săgeți miracolele care se petreceau în structurile respective și, nu cred să

fi fost cineva din institut care să nu aibe habar de ceea ce se petrecea între pereții lui. Până și o anostă ședință de sindicat se transforma într-o disertație științifică. Acolo vorbea pe înțelesul tuturor. Toți aflam cum e structurată baza de cercetare a institutului și cam ce face fiecare cercetător. Uneori măi apela la câte o pildă, dojenind delicat pe câte cineva, dar tot ce spunea era gândit ca activitatea în totalitatea ei să se desfășoare armonios. Nu-i plăceau stridențele, nu îngăduia duritatea, dar cultiva seriozitatea și fermitatea. Era altfel. Se impunea prin exemplul personal: de la ținută până la impactul fiecărui cuvânt adresat cuiva. Era de o punctualitate exemplară și atunci când programa pe cineva la o discuție și atunci când participa ca invitat. La fiecare eveniment științific nu pregeta să amintească de problemele societații noastre și să puncteze importanța implicării fiecăruia dintre noi la bunul mers al cetații. Era preocupat să transmită mereu mesaje ce puteau penetra crusta de egoism și indiferenta care sălășluia pe conștiința oamenilor.
Va rămâne pentru cei ce au avut șansa să-l fi cunoscut un punct incandescent în constelația sa.

Corina Neacșu

***

DIN AMINTIRILE UNUI CERCETĂTOR

…Se petrecea la un început de februarie, în urmă cu aproape 13 ani, mai exact pe 13 februarie 1996. Mă aflam în laboratorul "Disfuncții vasculare în Diabet" și emoția mă cuprinsese deja. „Cum va fi?" mă întrebam.
Mi se oferise posibilitatea, ca în urma unui interviu riguros cu Doamna Doctor Felicia Antohe, iar după aceea chiar cu Doamna Academician Maya Simionescu, să mă dedic cu totul cercetărilor științifice. Știam că fizicienii au fost cei dintâi care au abordat analiza conceptului de viață, dar mă temeam de necunoscut, de capacitatea sau incapacitatea mea de a face performanță într-un domeniu nou. Priveam nedumerită în jur, toți erau preocupați de munca lor. Dar, toate aceste temeri au dispărut pe masură ce mă integram în colectivul laboratorului nostru, printre colegii din Institut. Coordonatorul laboratorului în care am fost repartizată și în care sunt și acum, Doamna Doctor Doina Popov, a căutat cu toate prilejurile să-mi stimuleze interesul pentru munca de laborator, pentru inițierea în cercetarea științifică. Am învățat cum se abordează o problema de cercetare, cum se redactează o lucrare științifică, un proiect de cercetare. Ne-am bucurat și ne-am întristat împreună atunci când primeam întrebările și răspunsurile la articolele trimise spre publicare. Și astăzi suntem copleșite de aceleași emoții.
Au urmat perioada doctoratului și examenele de promovare. Am avut astfel șansa să o cunosc mai bine pe Doamna Academician Maya Simionescu. La examene era exigentă, fără să fie dură. Cu cât răspunsurile erau mai bune cu atât întrebările erau mai dificile. Se urmărea întotdeauna logica și judecata, corectitudinea și rigurozitatea

rezultatelor obținute. La fel se urmăresc și astăzi.
Îmi amintesc că la prezentarea tezei de doctorat Doamna Academician era emoționată la fel ca și mine. Discursul ținut mi-a arătat că reușise să vadă dincolo de aparențe, să cunoască omul din lăuntrul lui, să-l înțeleagă.
Am avut șansa ca sub aceeași îndrumare să-mi desfășor activitatea și în continuare, după terminarea doctoratului, în același laborator, în preajma acelorași oameni.
În toți acești ani am înțeles că în activitatea de cercetare nimic nu este impus, nici în privința temelor de cercetare nici a programului, totul decurge firesc. Firească mi se pare și prezența spiritului Domnului Profesor Nicolae Simionescu în laborator, în Institut. Tabloul cu portretul profesorului pe care l-am găsit la venirea mea în laborator, mai poate fi văzut și astăzi. Uneori am senzatia că mă urmărește cu privirea și simt o mare responsabilitate pentru tot ceea ce fac.
...Anii au trecut și mă încearcă nostalgia pentru momentele frumoase petrecute alături de colegi; mărturisesc că un edificiu multiform mi se pare acest templu al științei, iar cu totul diferiți sunt oamenii care îi trec pragul și diferite sunt forțele sufletești care îi conduc la acest templu.

Dr. Adriana Georgescu

***

Ușa Institutului s-a deschis pentru mine în anul 1994. A doua zi după examenul de licență plecasem de acasă cu gândul să-mi depun CV-uri pentru angajare la toate institutele din jurul facultații de biologie. Am intrat mai întâi la IBPC, pentru că în timpul examenului de licență văzusem pe tablă un anunț de angajare în IBPC pentru proaspeți absolvenți. Am dat interviu cu doamna dr. Ina Heltianu și mă pregăteam să plec și la celelalte institute. O ploaie de vară m-a întors din drum și n-am mai ajuns niciodată la celelalte institute! Trecusem de prima etapă de selecție și urma să mă prezint la interviu cu Profesorul Simionescu. În ziua interviului aveam mari emoții, fiindcă auzisem de personalitatea Profesorului. Gândeam că voi întâlni omul de știință afundat în gândurile lui și care mă va privi de sus și cu neîncredere. Toate gândurile mi s-au risipit când ușa biroului Profesorului s-a deschis și am fost poftită înăuntru. L-am găsit pe Profesor la biroul lui și am fost impresionată de câtă eleganță inspira. Eleganță în vorbă, în gestică, în îmbrăcăminte. Mi-a pus multe întrebări, iar la toate răspunsurile mele, el își nota într-un carnet niște semne. Știu că i-am spus despre tehnicile pe care le învățasem în timpul pregătiri lucrării de licență, dar am insistat să spun că nu făcusem nici o electroforeză cu mâna mea. Profesorul mi-a răspuns: ”vei face multe electroforeze de acum încolo”. Pentru mine a fost o rază de speranță, adică un viitor care se deschidea… Într-adevăr, peste puțin timp am fost anunțată că pot veni la Institut pentru a începe lucrul. La 1 august 1994 am sosit la institut și la intrare am întâlnit-o pe Luminița Rădulescu, care fusese și ea primită în rândul IBPC-iștilor. Din păcate, eu și Luminița am fost ultimele cercetătoare angajate de Profesor…
După o perioadă de acomodare în institut, doamna dr. Maya Simionescu ne-a chemat

și ne-a repartizat în laboratorul doamnei dr. Ina Heltianu. Eu urma să lucrez cu doamna dr. Ina Heltianu, iar Luminița cu doamna dr. Felicia Antohe. Mai târziu am aflat că s-a dat cu banul, pentru că repartiția noastră între cele două șefe să fie total aleatorie. Nu știu dacă pentru mine a fost cap sau pajură, știu însă că doamna Ina mi-a arătat atât primii pași în lumea fascinantă a cercetării, dar mi-a fost și îndrumător în laborator pe toată perioada stagiului meu de doctorat. Și astfel, zece ani am lucrat împreună cu doamna Ina, alături de care am învățat despre rigurozitatea experimentelor, molipsindu-mă totodată cu entuziasmul și pasiunea pentru această meserie.

În 1999 am avut o altă experiență, participând alături de doamna Maya la realizarea aplicației pentru obținerea titlului de Centru de Excelență și totodată a unui grant de mobilitate acordat de Comunitatea Europeană prin Programul Cadru 5. Împreună cu doamna Maya am lucrat o lună de zile până seara târziu. A fost o experință importantă pentru mine, pentru că am realizat cu câtă seriozitate trebuie abordat un astfel de proiect. În plus, în toată acea perioadă am fost uimită cu câtă putere de muncă și dedicație doamna Maya se apleca asupra proiectului. Nu pot să uit că, în ciuda faptului că mulți alți cercetători de la alte institute renunțau pe parcurs, doamna Maya nu putea fi oprită din muncă și nimic nu a influențat negativ realizarea proiectului nostru. Înainte de termen am avut o noapte albă, iar în zorii zilei proiectul trebuia tipărit și trimis prin poștă. Bineînțeles că printerul și calculatorul de rețea s-au blocat. Împreună cu doamna Maya, bântuind prin institut, pe la ora 5 dimineața am reușit să deblocăm printerul și calculatorul și să facem și copiile necesare. Când s-a deschis poșta eram deja cu proiectul în mână, gata de expediat. În anul 2000, Institutul a fost ales ca Centru de Excelență al Comunității Europene, spre bucuria tuturor, dar parcă mai mare, a mea…

La începutul anului 2004 mi-am susținut teza de doctorat, iar în toamnă, împreună cu doamna Maya am început realizarea altei aplicații la Comunitatea Europeană. De această dată, am mai avut un ajutor, cel al Madălinei Fenyo. Pot spune că perioada pregătirii acestui proiect a fost una cu multă muncă, dar și cu momente pline de haz. Aplicația trebuia trimisă electronic, așa că deși nu mai aveam problema tipăririi, totuși înaintea termenului a fost din nou o noapte albă. Ca să nu treacă momentul aplicației fără peripeții, serverul de la Comunitatea Europeană s-a blocat, iar termenul de depunere a fost extins cu o zi sau două - perioadă binevenită, ca orice zi dinaintea unui examen. Proiectul - SERA - a fost unul de succes și majoritatea cercetătorilor din institut au putut beneficia de stagii de specializare în laboratoare din străinătate sau au participat la diferite întruniri științifice în perioada 2005-2008.

Și iată-ne în 2009, când institutul împlinește 30 de ani de existență, iar pentru mine... 15 ani de când îmi e a doua casă!

Dr. Anca Gafencu

***

De aici, din Canada, gândurile mă poartă deseori către Institutul de Biologie și Patologie Celulară (IBPC) din București care poartă azi numele fondatorului său, Profesorul Nicolae Simionescu.
IBPC „Nicolae Simionescu" din București este locul unde, ca proaspăt absolvent de facultate am avut șansa să descopar tainele biologiei celulare de la doi maeștri ai domeniului: Prof. Nicolae Simionescu și Prof. Maya Simionescu. Domnul Profesor, așa cum îl numeam noi pe Prof. Nicolae Simionescu, avea o forță de muncă extraordinară și plăcerea nedisimulată a savantului care trăiește din plin bucuria noilor descoperiri din domeniul său de cercetare. Institutul, o oază de știință și cercetare avansată în România anilor '80 și mai departe, este de asemenea locul unde atât eu, cât și alți colegi ne-am format ca cercetători. Dupa 14 ani petrecuți în IBPC „Nicolae Simionescu" am plecat spre Canada cu regretul de a părăsi țara și un loc de muncă care devenise a doua mea familie.

Acum la 30 de ani de al înființarea institutului doresc să trimit un gând bun tuturor colegilor de muncă și recunoștința mea Acad. Maya Simionescu care a continuat să conducă mai departe destinele și standardul înalt al institutului, după trecerea în neființă a Prof. Nicolae Simionescu.

Mirela Hașu
27 may 2009,
University of Ottawa Heart Institute, Ottawa, ON, Canada

***

Vă mulțumesc foarte mult pentru această experiență atât de bogată, cum a fost vizita în acest institut. A fost momentul cel mai semnificativ al scurtei mele vizite în România și voi fi onorat să mă întorc din nou aici. Și mai important este cu siguranță faptul că mulți oameni de știință din multe țări vor dori să muncească aici, deoarece un astfel de mediu nu poate decât să stimuleze performanțele științifice.

Claude Lenfant
Centrul Internațional Fogarty, Institutele Naționale de Sănătate
Bethesda, SUA,
Ianuarie 1981

***

Mi-am dat seama că nu este niciodată prea târziu să înveți, să te bucuri că iubești, să dai și să primești. Cele mai călduroase urări colegilor mei din România.

Sampath Parthasarathy
Universitatea California San Diego, SUA
16 mai 1985

Nicolae și Maya,
Vă mulțumesc pentru minunata ospitalitate în această săptămână. Va rămâne o săptămână foarte memorabilă în cariera mea științifică.
Felicitări pentru a zecea aniversare a institutului. În acești zece ani voi ați cîștigat o reputație mondială recunoscută pentru excelența în știință și reprezentați un model renumit pentru viitorii oameni de știință români.

Urările mele cele mai bune pentru viitor,

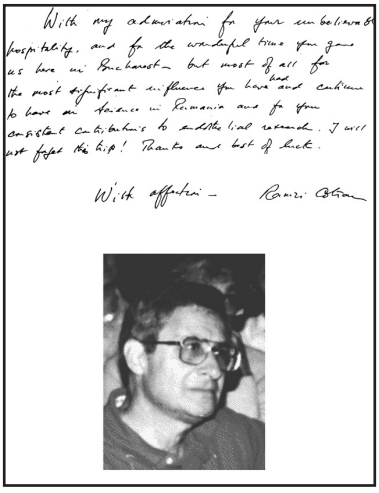
Bryan Brewer, Jr.
Directorul Diviziei de Boli Moleculare a Institutelor Naționale de Sănătate
Bethesda, SUA
1 septembrie 1989

***

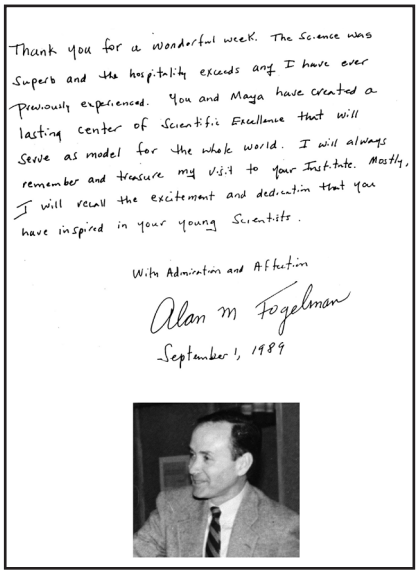
Cu admirația mea pentru incredibila voastră ospitalitate și pentru sejour-ul minunat pe care ni l-ați oferit aici în București, dar mai mult decît orice, pentru influența cea mai evidentă pe care voi ați avut-o și continuați s-o aveți asupra științei din România și pentru contribuțiile voastre consistente la cercetările asupra endoteliului. Nu voi uita această călătorie.

Vă mulțumesc și vă doresc cel mai mare succes.

Cu afecțiune,
Ramzi Cotran
Profesor și Chairman al Departamentului de Patologie al Universității Harvard Boston, MA, SUA , Președintele Societății Americane de Patologie
1 septembrie 1989


With my admiration for your incredible hospitality, and for the wonderful time you gave us here in Bucharest but most of all for the most significant influence you have and continue to have on science in Romania and for your consistent contributions to endothelial research. I will not forget the trip! Thanks and best of luck.

With affection – Ramzi Cotran


Thank you for a wonderful week. The Science was Superb and the hospitality exceeds any I have ever previously experienced. You and Maya have created a lasting center of Scientific Excellence that will serve as model for the whole world. I will always remember and treasure my visit to your Institute. Mostly, I will recall the excitement and dedication that you have inspired in your young Scientists.

With Admiration and Affection

Alan M Fogelman

September 1, 1989

Vă mulțumesc pentru această săptămână minunată. Știința a fost superbă, iar ospitalitatea depășește pe oricare am întâlnit-o pînă acum. Tu și cu Maya ați creat un centru durabil de excelență în știință care va servi drept model pentru întreaga lume. Îmi voi aminti și prețui pentru totdeauna vizita mea la institutul vostru. În mod special voi memora stimularea și dăruirea pe care ați inspirat-o tinerilor voștri cercetători.

Cu admirație și afecțiune,

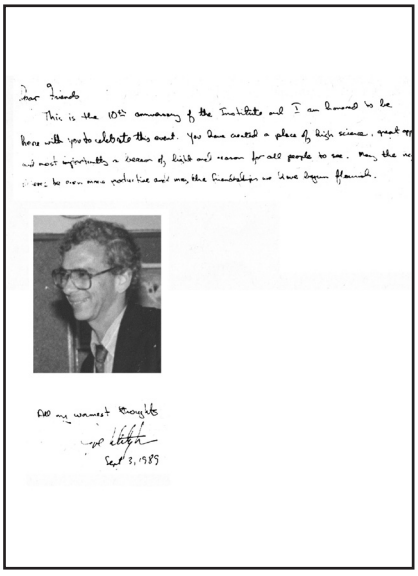
Alan M. Fogelman
Profesor și Director al Diviziei de Cardiologie
a Universității din Los Angeles, CA, SUA
1 septembrie 1989

***

Dragi prieteni ,
Aceasta este a X-a aniversare a institutului vostru și sunt onorat să fiu aici cu voi la celebrarea acestui eveniment. Voi ați creat aici un așezământ de știință de înaltă calitate, de mari oportunități și, mai presus de asta, o sursă de lumină și rațiune pentru toți oamenii. Fie ca următorii zece ani să fie și mai productivi, iar prietenia începută să înflorească.

Cu cele mai calde gânduri,

Joe Witzum
Profesor, Departamentul de Medicină Internă,
Universitatea California San Diego, SUA
3 septembrie 1989


Dear Friends

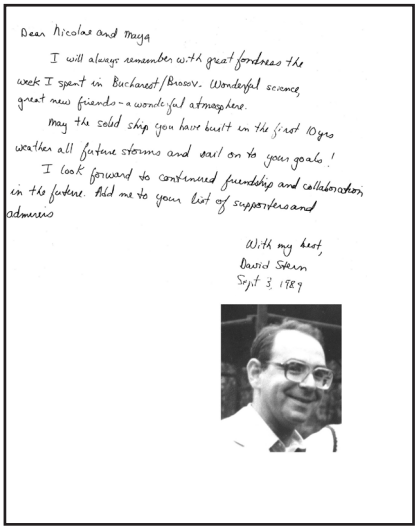
This is the 10th anniversary of the Institute and I am honored to be here with you to celebrate the event. You have created a place of high science, great opportunity, a beacon of light and reason for all people to see. May the next ten be even more productive and may the friendships we have begun flourish.

And my warmest thoughts

Sept 3, 1989

Dragă Nicolae și Maya,
Îmi voi aminti întotdeauna cu multă duioșie săptămâna pe care am petrecut-o în București/Brașov. Știință minunată, noi prieteni extraordinari – o atmosferă minunată. Fie ca solida corabie pe care ați construit-o în primii zece ani să înfrunte toate furtunile viitoare și să navigheze spre scopurile voastre!
Sper într-o continuă prietenie și colaborare în viitor. Adăugați-mă la lista voastră de suporteri și admiratori.

Cu cele mai bune urări,
David Stern
3 septembrie 1989


Dear Nicolae and Maya
I will always remember with great fondness the week I spent in Bucharest/Brasov. Wonderful science, great new friends - a wonderful atmosphere.
May the solid ship you have built in the first 10 yrs weather all future storms and sail on to your goals!
I look forward to continued friendship and collaboration in the future. Add me to your list of supporters and admirers
With my best,
David Stern
Sept 3, 1989

***

Pentru Maya și Nicolae,
Mulțumesc pentru această neașteptată și incredibilă experiență. Am venit fără să știu ce să mă aștept și îmi găsesc greu cuvintele să descriu ceea ce am găsit. Unicitatea acestui institut creat de voi constă în combinația între calitate și bucuria de a lucra. Am vizitat laboratoare din diferite părți ale lumii, dar niciodată până acum nu am avut privilegiul să întâlnesc atât de mulți oameni de știință de primă clasă, depunând atâta pasiune în munca lor. Acest institut este creația voastră. Vă felicit. Vă salut.

Michael Balls
Secretarul General al Organizației Europene de Biologie Celulară
Universitatea din Nottingham, Anglia
11 iunie 1982

***

Cu mare admirație pentru munca profesorilor Simionescu, pentru semnificația ei în medicină, pentru înțelegerea între oameni, pentru prestigiul țării lor, pentru pregătirea studenților și în beneficiul tuturor acelora care au o inimă în piept. Le doresc succes continuu în tot ceea ce întreprind.

Roger Kirek
Ambasador al Statelor Unite ale Americii
17 iunie 1987

Vizitarea acestui institut de cercetări remarcabil a fost o ocazie cu totul deosebită. Nu poți să nu fii impresionat de spiritul efortului scolastic care domnește peste tot, ca și de devotamentul și pasiunea omniprezente.
Sunt mai convins ca niciodată că natura muncii dumneavoastră și rezultatele ei vor contribui cu siguranță la înțelegerea atât a (pato)fiziologiei, cât și a viitoarei ere terapeutice.

Erik Tomlinson
Fundatia Ciba-Geigy, Horsham, Departamentul de Farmacie
Universitatea din Nottingham, Anglia
21 sept. 1987

***

Nu găsesc cuvinte să îi spun Doamnei Simionescu și colaboratorilor săi cât de mult sunt impresionat de Institutul care poartă numele gloriosului său fondator. Este remarcabil faptul că, în ciuda numeroaselor obstacole, aveți siguranța unei calități a cercetării recunoscute de Comunitatea Europeană și este cu totul meritoriu faptul că sunteți Centru de Excelență. Sunt convins că vom stabili o colaborare foarte bogată și mulțumesc Prof. Montreuil, care este la originea acestei apropieri.

Prof. Jean-Charles Fruchart
Institutul Pasteur și Universitatea din Lille, Franța
1 martie 2002

***

AMINTIRI DESPRE CEI DOI SIMIONESCU

Sunt bucuros să am ocazia de a spune câteva lucruri despre Maya și Nicolae Simionescu, pe care i-am cunoscut la Yale la sfârșitul anilor '70 și începutul anilor '80, când eram conferențiar la Secția de Biologie Celulară de la Yale. La acea vreme, ei soseau la Yale anual și susțineau cursul de Biologie Celulară, piatra de încercare a educației la Facultatea de Medicină, curs organizat și condus de George Palade și de Marilyn Farquhar. Împreună cu Maya și Nicolae am avut responsabilitatea predării histologiei. Pentru mine personal, lucrul cu cei doi Simionescu a fost o experiență remarcabilă. Ei prezentau un impresionant exemplu de dedicatie, entuziasm și competență. Totul trebuia preparat și planificat dinainte, în cel mai bun mod posibil. Nu lăsau nimic la voia întâmplării și a improvizațiilor. Erau foarte exigenți asupra calității cursurilor pe care le predau și acest standard l-au transmis și colegilor mai tineri, cum eram eu. Iar studentii le apreciau cursurile cu cele mai înalte calificative. Astăzi, când întâlnesc doctori sau cercetători care au fost educați la Yale, descopăr ca și ei au amintiri

minunate despre Maya și Nicolae.
Îmi făcea plăcere să-i văd venind în fiecare toamnă și le simțeam lipsa la sfârșitul cursului.Aduceau cu ei o perspectivă revigorantă în atmosfera unei instituții americane privilegiate. Era evident că cei doi Simionescu își puseseră toata energia (și mai mult decât atât) în crearea noului Institut de la București. Dedicarea lor unei „cauze", aceea de a creea un centru științific de excelență în țara proprie a fost extraordinară. De fapt, ei au fost cei care m-au inspirat la întoarcerea mea în Italia, după o prima perioadă în SUA. Am fost fericit să fiu multi ani în contact cu cei doi Simionescu, a fost o bucurie totdeauna să ne revedem și să aflu progresele lor științifice și despre Institutul lor. Când viața m-a adus înapoi în America la sfârșitul anilor '80, m-am bucurat din nou de susținerea lor. Nu aș fi azi unde sunt dacă nu ar fi fost ei.
Este cu adevărat remarcabil ceea ce au înfăptuit Maya și Nicolae. Cu rezultatele cercetărilor lor au contribuit la conturarea formei actuale a biologie celulare a vasculaturii. Totodată, ei au contribuit la conturarea științei în țara lor și au creat un Institut excepțional în Europa de Est.

Pietro De Camilli, M.D.
Eugene Higgins Professor, Department of Cell Biology
Howard Hughes Medical Institute, Yale University School of Medicine
24 mai 2004

***

IBPC LA VÂRSTA ADUCERILOR AMINTE

Tristețea se amestecă cu bucuria acum, când ne pregătim să sărbătorim Institutul lui Nicolae Simionescu - în absența lui. Ce ironie a sorții a făcut ca el să fie doborat tocmai de maladia care a constituit subiectul de cercetare al Institutului. Noi ne simțim extrem de privilegiați de a avea împreună cu Nicolae și Maya o întreagă comoară de amintiri, unele chiar de acum 28 de ani, din etapa pe care am putea-o numi stadiul embrionar al Institutului.
În 1975 am întâlnit doi biologi celulari eminenți, cunoscuți ca „Cei doi Simionescu" (și, uneori, inevitabil, „SimoNIESCUs"). Ei au fost aleși personal de Dr. George Palade în București; în laboratorul renumit al Dr. Palade, au devenit pasionați de studiul endoteliului. La acea vreme, endoteliul era peste tot (ceea ce așa și este) și fiecare cercetător in acest domeniu și-a dat seama că, dacă vrei să știi noutățile asupra endoteliului, trebuie să vii in contact fie cu unul, fie cu ambii cercetători români. Ne-a făcut cunoștință cu ei Dr. Palade, iar prietenia noastră a fost instantanee (de fapt, Nicolae ne-a fost martor la nuntă). În cercetare, ei aveau aceleași standarde riguroase ca Dr. Palade; aveau același accent distinct „RRRomanian", lăsând impresia că, pentru a fi la vârful biologiei endoteliului, trebuie să ai o pronunție adecvată a unor cuvinte ca „RRRibosomes" și „TRRRanscytosis" (și aceasta era adevărat).

Cei doi Simionescu au arătat clar că ei nu erau dezertori din România, ci dimpotrivă, ei așteptau să se construiască noul lor Institut conform cu planurile pe care le trasasera cu atenție și grijă. Noi lucram în Worcester, la Universitatea din Massachusetts, Facultatea de Medicină. Distanța dintre New Haven și Worcester era prea mare doar pentru a lua masa împreună, așa că ne întâlneam la jumătatea drumului. Dacă aveam timp suficient, petreceam un sfârșit de săptămână la Haven sau la Worcester. Oriunde ne întâlneam, discutam în detaliu experimentele noastre; nicicând nu ne-am gândit că eram, în fapt, competitori.

Nicolae și Maya desenau planurile viitorului Institut pe servețelele de hârtie de la restaurant. Părea ca un vis de cercetător: biologi desenând cuibul lor științific, un cuib care include biologie și patologie. După câte cunoaștem noi, această caracteristică a IBPC era unică la acel moment; cele două litere reunite - BP - reprezintă un plan de lucru, dar și o filosofie a naturii: patologia nu este o știință per se, ci o extindere a biologiei normale. Virchow, fondatorul patologiei moderne, exprima acest concept în 1858: „Patologia este fiziologia cu obstacole" („Physiologic met Hindemissen"). Rezultă că nu poți înțelege complet „normalul", fără starea anormală, și invers.

Deschiderea oficială a IBPC a fost în 1979. O veste bună, dar viața a devenit și mai stresantă pentru soții Simionescu; în baza unui contract oficial, ei urmau să vină în fiecare an pentru 3 luni în SUA, în scopul unor cercetări și activități didactice avansate. Dar dacă Guvernul le refuză viza de ieșire? Ce s-ar fi întâmplat cu angajamentele de la Universitățile Yale, Columbia, Rockefeller sau din alte locuri, unde Maya și Nicolae erau implicați în activitatea didactică? Aceasta catastrofă a fost cât-pe-ce sa se întample de mai multe ori, iar stresul ei a fost greu de suportat chiar și de către noi.

În ultimii ani am avut de două ori plăcerea și onoarea de a vizita IBPC. Primirea organizată de soții Simionescu pentru musafiri era așa de extraordinară, încât aspectele umane, ca și rezultatele științifice au rămas de neuitat. Unul din noi (G.M.) a fost impresionat de numele frumoase ale doamnelor: Doina, de exemplu, sună în urechea unui italian ca două note muzicale ale unui instrument străvechi.

Cu toate lipsurile și dificultățile vremurilor, Nicolae și Maya reușeau să organizeze pentru vizitatori meniuri românești de neuitat. O altă experiență miraculoasă, de data aceasta pentru urechea muzicală, au fost sunetele unui violonist, un domn mai în vârstă, care ne-a încântat cu melodille sale. În timp ce cânta la vioară, se apropia blând de urechea noastră și eram martorii unui sunet pur, de muzică pură, aproape fără nici un zgomot mecanic interferent. A fost extraordinar, iar pentru un violonist amator este aproape imposibil de realizat așa ceva.

Când am vizitat laboratoarele, am fost uluiți de eforturile echipei de cercetare în numele „economiei". În ultimul moment, guvernul decisese să plătească salariile, dar nu și materialele de laborator. Nimic nu era de unică folosință; nici chiar soluțiile. Când minusculele preparate ce urmau a fi examinate prin microscopie electronică erau fixate în osmium, acest reactiv era re-extras și refolosit. Judecând după rezultate, această metodă - disperată, după cum ni s-a părut nouă - a dat rezultate. În anii din urmă am văzut exemple minunate ale „economiei" în microscopie electronică

folosind fragmente de valve aortice de la animale cu hipercolesterolemie.
Micrografiile electronice ale „liposomilor" peretelui vascular, situați sub un endoteliu intact sunt până astăzi cea mai bună reprezentare a leziunilor aterosclerotice incipiente vizibile prin microscopie electronică.
Noi am fost și martorii timpurilor grele trăite sub dictatură: greutățile zilnice sau chiar ale fiecărei ore erau așa de departe de tot ce este normal și uman, încât azi par a fi de necrezut. Nicolae era intransigent, și la fel si Maya, patenera sa esențiala în știință și în viață. Umorul nestăvilit al lui Nicolae l-a ajutat poate, dar riscurile pe care și le-a asumat erau zilnice. Maya și Nicolae au refuzat rațiile suplimentare oferite prietenilor regimului. Ca Director al Institutului, Nicolae era obligat să afișeze portretul dictatorului în biroul său. El l-a atârnat undeva afară și-l arata vizitatorilor spunând: „Wrong Nicolae".
Pentru cercetătorii noilor generații care lucrează liniștiți la mesele de laborator este imposibil, poate, să-și imagineze cum era să efectuezi experimente la aceleași mese, în aceleași laboratoare, sub un regim dictatorial. O criză se putea produce în orice moment. Nicolae trebuia să fie permanent pregătit să aplaneze orice măsură care venea de la oficialități. De exemplu, într-o bună zi a aflat că Institutul va fi dărâmat imediat, deoarece interfera cu priveliștea viitoare de la ferestrele Palatului Poporului. Încearcă să faci un experiment, când o astfel de perspectivă plutește în aer!
Poate este normal să uităm acele vremuri - dar nu trebuie să uităm niciodată curajul celor care au ținut făclia pe drumul drept și corect în timp de furtună. Acest tip de curaj, mergând până la uitarea de sine, se numeste eroism.
Anul 1995 a adus o lovitură cruntă: Nicolae a plecat brusc dintre noi. Maya a fost de admirat, ca de obicei. În stilul tipic Simionescu, ea a continuat să lucreze cât doi, cu energia care trebuie să-i fi motivat pe înaintașii lor, Dacii.
Suntem mândri de a fi prietenii ei și ai Institutului de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" - un centru de excelență pentru știință si pentru umanitate.

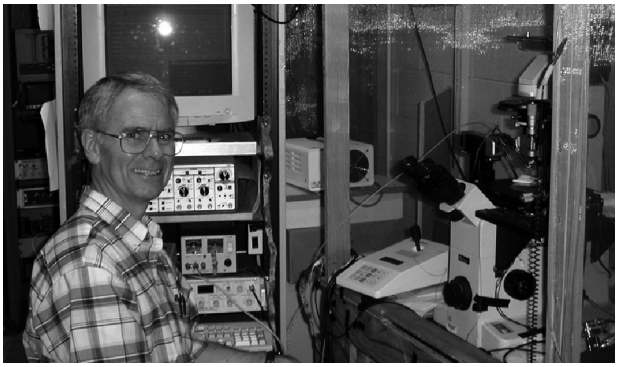
Isabelle Joris-Majno și Guido Majno
University of Massachusetts
2004

***

AMINTIRI DESPRE INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ ȘI DESPRE FONDATORII SĂI

Fondatorii IBPC, Nicolae și Maya Simionescu mi-au fost colegi, prieteni apropiați și, în multe privințe, cel de-al doilea rând de părinți în cea mai mare parte a carierei mele științifice. Eram absolvent și studiam cu George Palade și Jim Jamieson la Universitatea Rockefeller, când l-am cunoscut pe Nicolae și apoi pe Maya, care începuseră acolo studiile asupra structurii fine și permeabilității microvasculaturii. În

anii care au urmat am participat împreună la naşterea biologiei celulare moderne. În timp ce eu eram interesat de explorarea zonei distale din calea de secreţie în celule exocrine, am fost martorul explorării sistematice a permeabilităţii capilarelor în stilul Simionescu, şi la definirea variatelor forme ale transcitozei care sunt astăzi recunoscute ca proprietăţi ale endoteliului. La acea vreme, Rockefeller era paradisul nostru intelectual, un loc de refugiu într-un oraş tumultos, un loc unde eram uniţi prin dragostea pentru biologia celulară şi eram feriţi de orice alte lucruri exterioare care ne-ar fi distras atenţia. În multe privinţe cred că acest mediu a servit ca model pentru ceea ce a creeat Nicolae şi Maya la IBPC în Bucureşti.



În 1973, Nicolae, Maya şi cu mine ne-am „transcitat" împreună din New York la New Haven. Mutarea la Facultatea de Medicină Yale a fost importantă pentru IBPC din cel putin două privinţe: prima, a marcat începutul perioadei când „discipolii" Simionescu au fost trimişi la laboratoare internaţionale, în scopul de a forma conducători de grupuri de cercetare pentru viitorul Institut; a două, a fost locul în care cei doi Simionescu au început cea de-a doua carieră, ca arhitecţi ai activităţii fizice din IBPC. Îmi amintesc creionarea viitorului Institut de către echipa ştiinţifică de renume a celor doi Simionescu, alegerea înţeleaptă a direcţiilor ştiinţifice, discuţiile periodice cu George Palade; pentru mândrii părinţi, procesul de naştere al IBPC a semănat cu nouă ani de eforturi... (în loc de o gestaţie de... nouă luni). Interacţia mea cu cei doi Simionescu la Yale a avut şi o conotaţie personală importantă, deoarece m-am întors în 1978 în calitate de cadru didactic de Biologie Celulară, iar Nicolae a fost mentorul meu în primul an de predare la studenţii medicinişti. Îmi sunt vii în minte până azi lucrurile pe care le-am învăţat sub conducerea sa – descrierea logică şi ierarhică a organizării secţiunilor histologice, discutarea funcţiei fiziologice în contextul structurii şi rolul acestui eşafodaj pentru înţelegerea patologiei ţesuturilor. Sunt sigur că mulţi dintre dumneavoastră înţeleg ce vreau să spun! Şi azi continui să-i fiu recunoscător lui Nicolae care a menţinut standardul meu educaţional la cel mai înalt nivel. Şi tot acum, la împlinirea a 25 de ani de profesorat la Facultatea de Medicină, continui să folosesc cu mândrie bogatul set de ilustraţii splendide din capitolul celor doi Simionescu din Manualul clasic de Histologie editat de Weiss şi Greep.

Deşi încă nu am vizitat IBPC, experienţa mea cu Nicolae şi Maya m-a făcut să apreciez în mod deosebit modul în care poţi trăi la un nivel ştiinţific ridicat şi în care poţi

aduce contributii ştiinţifice valoroase. IBPC, o temelie ştiinţifică modernă dedicată înţelegerii proceselor biologiei celulare şi a celor patologice este astăzi, după 25 de ani, Centru de Excelenţă al Comunităţii Europene, fapt cu adevărat remarcabil. Acest Institut este o moştenire concretă, rezultat al combinării viselor, viziunilor, descoperirilor, creativităţii şi perseverenţei. Este un model viu pentru fiecare din noi. Închei cu urarea de felicitări din inimă şi urez IBPC inspiraţie şi succese şi în următorii 25 de ani!

J. David Castle
Profesor de Biologie Celulară
Director al Programului de Biologie Celulară şi de Biologie a Dezvoltării,
Universitatea din Virginia, SUA
2004

***

EVOCAREA UNEI PERSONALITĂŢI CREATOARE ÎN ŞTIINŢELE BIO-MEDICALE: PROFESORUL NICOLAE SIMIONESCU

Cu emoţie scriu aceste rânduri evocatoare, dăruite şi nu formale. Figura lui Nicolae Simionescu induce o puternică personalitate, răpită aşa de devreme din comunitatea ştiinţifică. Un creator de adevăr ştiinţific, un creator de instituţii, un ideal pentru tineri care vor aspira să ajungă acolo unde a ajuns el. Câte aş putea spune! Sunt emoţionat de ultimele lui cuvinte pe care le-am auzit la Academia Română după ce a prezidat şedinţa de intrare a unui coleg care şi-a rostit cuvântul de recepţie. L-am oprit şi i-am spus: „De ce te oboseşti aşa de mult? Trebuia altcineva să vorbească!" Nu e cazul să explic de ce! A răspuns: „V-am urmat exemplul pentru că sunteţi pentru mine unul din maeştrii mei." Acestea au fost ultimele cuvinte. M-a mişcat profund şi acum evocându-l nu o fac pentru mine, o fac pentru el, care nu şi-a renegat maeştrii. Ne-a arătat că nimeni nu vine în ştiinţă fără o formaţie istorică.
A vrut să facă şi în Academia Română tot ce trebuia. S-a devotat şi în această instituţie, să-i confere alt orizont ştiinţific, a elaborat planul grant-urilor competitive, contracte de cercetare, realizate prin respectarea libertăţii creatoare.
Ce exemplară a fost cunoaşterea noastră când a venit prima oară lângă mine! Eram atunci directorul Institutului de Endocrinologie. Apare în faţa mea, neaşteptat - un tânăr. Dar ce înfăţişare avea! Privirea lui, o văd halucinant în această evocare. „Vă rog să mă primiţi să lucrez în institutul ce-l conduceţi." „Dar de ce?" l-am întrebat. „Ştiu că eşti conferenţiar de anatomie la facultate, şi solicitat de cei mai mari chirurgi să devii chirurg" (a fost colaboratorul lui Juvara). Putea să fie un mare chirurg, un distins anatomist şi profesor. Renunţă la aceste posibilităţi şi vine în faţa mea. L-am întrebat: „Ce vrei şi de ce?" „Vreau să lucrez în ştiinţă." Adică în această nobilă preocupare a

omului care caută să pătrundă tainele Universului. Pentru că noi facem parte dintr-un Univers cu misterele lui. Niciunul dintre ele nu se poate explica, de ce este sau cum este. Suntem! În acel tânăr, care a apărut în fața mea, am simțit patosul lui, acea forță interioară căreia nu-i rezistă nimic. Renunță la două posibilități de afirmare din toate punctele de vedere și vine într-o instituție în care i se oferă două camere modeste la etajul întâi la Biobază. Și ce? Un microscop optic modest, un microtom și câteva substanțe colorante, așa cum se găseau atunci. Le-a perfecționat, a schimbat totul. Ce tensiune interioară, ce aspirație spre cunoaștere! Știința ne permite o reflectare mai reală a tot ceea ce vedem căutând explicația fenomenelor. A demonstrat-o din plin.

Nicolae Simionescu nu a semnat niciodată condica, a fost un colaborator fără program birocratic. Atunci când începea o cercetare, dacă trebuia să stea noaptea, rămânea și dormea în laborator până la terminare. Într-o zi i-am spus: „Prin acest laborator au trecut mulți și nu au descoperit ce se poate vedea". Într-adevăr, în cancerul glandei tiroide, pe lângă care trecuseră alții, a reușit să vadă cancerul medular. Se știe că tiroida are două varietăți de celule: celulele C și celulele foliculare. Cancerul banal, cunoscut, este cel folicular, dar acela din celulele C este cancerul medular. „Nu se poate, i-am spus, să nu fie printre zecile de cazuri operate". L-a găsit! Acei ochi pătrunzători și mintea care se ascundea îndărătul lor, cât a pătruns în ceea ce alții nu au văzut! A fost un descoperitor; el a adunat după aceea cazurile de biopsie ale cancerului tiroidian, care se operau în institut și i-am propus să scriem împreună o sinteză. Nu trebuiau să rămână numai în comunicări. „Sinteza rămâne pentru că reflectă gândirea asupra faptelor pe care le prezinți". Am semnat împreună propunerea la Editura Academiei pentru „Formele anatomo-clinice și fizio-patologice ale cancerului tiroidian". S-a devotat problemei cu aceeași stăruință și înțelegere afectivă. Era sensibil în procesul cunoașterii. Este explicabil de ce am comunicat cu el în diferite împrejurări. Este de fapt un factor condițional al cunoașterii. A luat de la mine, dar și eu am primit de la el. Acest tonus misterios pe care fiecare din noi poate să-l aducă, dacă e dăruit. Am refuzat în final ca lucrarea să fie semnată împreună, pentru că eu nu aveam ce căuta, când totul era el. Așa de bine era elaborată și originală. Descifrase peste zece forme anatomo-clinice și fiziopatologice pe care nimeni nu le-a văzut în literatură. Ce căutam eu acolo? Să parazitez gândirea și opera lui? Nu! Și așa a apărut „Histogeneza Cancerului Tiroidian", tradusă apoi în engleză și publicată la cererea a două edituri din Anglia și SUA (W. Heineman Medical Books Ltd., London Grune și Stratton, New York). Contribuția lui, în Institutul de Endocrinologie a fost marcantă, cu trăsături originale. N-a fost repetitor; a gândit în nou. În condițiile extrem de simple, pe care i le-am oferit atunci, a organizat evidența lucrărilor și sistematizarea lor. Laboratorul era impresionant prin această ordine care reflecta personalitatea lui.

Am mărturisit doar unele aspecte din comuniunea cu Nicolae Simionescu; ceea ce este caracteristic, instructiv și exemplar pentru personalitatea acestui mare învățat care a dispărut așa de timpuriu.

La prima vizită a Profesorului G. E. Palade în Institutul de Endocrinologie, nu mi-a cerut decât să-l vadă pe Simionescu. Îl cunoștea de la catedra de Anatomie. După vizita de

câteva ore, Prof. G. E. Palade mi-a spus: "Luptă-te pentru el" (era greu atunci să pleci în străinătate, trebuia să-ţi iei răspundere ş.a.m.d.- în perioada comunistă). „Poate mai mult decât îi oferi aici." Şi într-adevăr a demonstrat cu prisosinţă aceste posibilităţi.
A început astfel o nouă perioadă fecundă în activitatea lui ştiinţifică şi profesională, reuşind în colaborare (începută încă din Institutul de Endocrinologie) cu distinsa şi dotata sa soţie să-şi perfecţioneze metodele de cercetare, să-şi însuşească cu pasiune metodologia contemporană, impunându-se prin rezultatele obţinute în institutele de cercetare şi învăţământ din SUA. I-a fost acordat gradul de profesor la două universităţi americane şi s-a impus internaţional la congrese şi invitaţii prin capacitatea de reprezentare a unei activităţi devotate.
S-a reîntors în ţară după o îndelungată absenţă, cu hotărârea de a construi un institut consacrat biologiei celulare. Pe un loc viran, cu discreţie, aproape în secret, a construit împreună cu Maya Simionescu Institutul de Biologie şi Patologie Celulară. Este opera lui. Asemenea marilor constructori ai ştiinţei medicale româneşti, a introdus Biologia şi Patologia Celulară în ţara noastră, a lăsat poporului nostru o instituţie în care se poate dezvolta ştiinţa, se poate învăţa, se poate găsi noul şi arăta că noi putem fi creatori. El a demonstrat din plin această capacitate. Nu trebuie să-l uităm! Cei care uită, sunt uitaţi la rândul lor.

Academician Ştefan Milcu

***

Institutul de Biologie si Patologie Celulară este asemănător unei opere de artă, prin concepţia ce a stat la baza construcţiei sale, prin distribuţia spaţiilor şi prin armonia legăturilor funcţionale. Nu este surprinzător că a fost realizat astfel de către doi ilustri elevi ai şcolii româneşti de biologie şi medicină, care au reuşit să se impună prin opera lor în lumea ştiinţifică contemporană şi să ajungă la poziţii de prestigiu. Elevilor şi prietenilor mei, Dr. Nicolae şi Maya Simionescu, le datorăm admiraţia şi recunoştinţa pentru tot ce au făcut şi pentru tot ce vor dărui ştiinţei în anii viitori, ce-i dorim să fie îndelungaţi şi rodnici.
Vă urez o deplină realizare în tot ce întreprindeţi!

Academician Ştefan Milcu
5 mai 1980

***

Îl cunosc pe Dr. Simionescu din 1953 când, în dorinţa mea de a avea colaboratori tineri şi dornici de a se instrui, a fost numit în Clinica de Chirurgie pe care o conduceam. Am lucrat împreună 4 ani, tânărul Dr. Simionescu distingându-se prin întreaga sa activitate, ca un element ieşit din comun, poate prea bun pentru a rămâne doar un „simplu

chirurg". Așa se face, probabil, că a a trecut în cercetarea științifică fundamentală în care i-am urmărit activitatea și care a culminat prin specializarea sa în Biologie Celulară. Institutul pe care îl conduce, conceput personal atât din punct de vedere organizatoric, cât și functional, precum și calitatea cercetărilor sale deosebite, marchează din plin calitățile sale deosebite pe care le-am constatat cu ocazia colaborării noastre. A știut să-și aleagă colaboratorii, a știut să-i dirijeze creând o unitate de cercetare care reprezintă un unicat în țara noastră. Vreau să subliniez, de asemenea, simtul său patriotic, în sensul creării în țara noastră a unei școli de cercetare cu răsunet internațional.
Soția sa, Maya Simionescu, a fost și este o colaboratoare excepțională care l-a secondat permanent în întreaga sa activitate. Îi felicit pe soții Simionescu și le doresc mari succese în activitatea lor.

Cu veche și constantă prietenie,
Prof. Ion Juvara
August 1983

***

CUVÂNT LA A 20-A ANIVERSARE A IBPC

Înființarea Institutului de Biologie și Patologie Celulară, în anul 1979, a constituit atunci, un fenomen de excepție, o aventură aproape incredibilă. A reuși implantarea unei instituții științifice de vârf, de tip occidental, era ceva efectiv de domeniul fantasticului. Și, totuși, acest Institut s-a născut, a funcționat și am văzut cum s-a dezvoltat ca un centru de excelență al științei românești, nu doar din 1999, când a primit această etichetă, ci încă de la început.
Sigur că elementul conjunctural al sprijinului moral primit din partea Profesorului George Palade a fost esențial, dar factorii decisivi au fost existența, calitățile, strădaniile și abnegația părinților acestui Institut, soții Nicolae și Maya Simionescu. Valoarea lor ca personalități științifice, susținută de renumele dobândit prin opera științifică realizată au fost ceea ce a permis dobândirea încrederii și de partea cealaltă a Atlanticului, unde funcționa în continuare un sistem de apreciere realistă, exigentă, aș zice chiar dură a valorilor, și faptul că au trecut cu bine acest examen și apoi, au reușit să-l treacă în continuare, cu întreaga echipă, dupa înființarea Institutului, acum 20 de ani. Grant-urile obținute au constituit oxigenul pentru funcționarea în continuare a noului Institut. Dar, pentru ca materialele, reactivii să ajungă în strada Hașdeu, a fost nevoie de multe strădanii, de multe subterfugii și de eforturi disproporționat de mari.
Echipa a crescut și s-a maturizat. A trecut de bună-seamă printr-un proces de selecție naturală. Au rămas dintre cei mai buni. Este o adevarată echipă, foarte unită în jurul căpitanului navei și a secundului său și, pentru toți, motivația trece prin inimă și prin neuronii de elită, și mai puțin prin pusculiță. Curând dupa Institut, s-a creat Societatea

Națională de Biologie Celulară, lărgind sfera de acțiune a Institutului.
După decembrie '89, când zidul Berlinului dispăruse, îl folosesc ca simbol, și totul părea să se fi schimbat. Profesorul Nicolae Simionescu și-a dirijat firesc activitatea și pe un plan mult mai larg, întreprinzând o adevarată cruciadă pentru instaurarea unui sistem coerent și corect de judecare a valorilor în cercetarea românească. A fost uneori aproape mai greu decat înființarea Institutului. Nu mai era vorba numai de implantarea unui grefon sănătos și viguros într-un organism bolnav, era vorba de încercarea de a vindeca însuși organismul. Și s-a dedicat acestui ideal cu aceeași obstinație, cu același optimism și cu binecunoscuta sa bună-credință. A fost și de data aceasta o ocazie de a face uz de cea mai rară și cea mai prețioasă formă de curaj: curajul intelectual. Și roadele au început să se arate, chiar dacă mai timide și mai lente, la început, decât le-ar fi dorit impetuozitatea lui.
Astăzi, D-na Maya Simionescu ține nu numai cârma Institutului și a Societății Naționale de Biologie Celulară, dar se îngrijește și de continuarea a ceea ce începuseră împreună pentru vindecarea mentalităților în știința românească. Și îi dorim din toată inima succes pe toate fronturile, atât domniei sale, cât și tuturor membrilor echipei, întregului Institut pe care îl aniversăm astăzi.

Profesor Dr. Andrei Combiescu
Director al Institutului de Microbiologie și Imunologie „ I. Cantacuzino"
1999

***

CUVÂNT LA A 20-A ANIVERSARE A IBPC

În cei 20 de ani de când pionierii și conducătorii Institutului, Profesorul Nicolae Simionescu și Profesor Maya Simionescu, au pus bazele Institutului, ei și Institutul lor au intrat în istoria științei, a cardiologiei și a învățământului din țara noastră. Permiteti-mi să explic de ce Institutul a fost și este un exemplu pentru noi toți, foruri academice, științifice și universitare.
În primul rând, au creat pentru cercetarea medicală și pentru cercetarea biologică standarde care au devenit de referință pentru țara noastră. Aceste standarde sunt standardele medicinei și biologiei din Europa și Statele Unite, standarde către care trebuie să tindă cercetarea științifică de pretutindeni. Metodologia lucrărilor Institutului, planificarea cercetării, modul de prezentare în reuniunile științifice, publicațiile din revistele de specialitate, modul de constituire a echipelor de cercetare, cel puțin toate acestea au plasat Institutul într-o poziție de referință pentru medicina noastră și pentru cercetarea științifică de la noi.
În al doilea rând, aș vrea să subliniez că, de la început, conducătorii Institutului și cercetătorii din Institut s-au concentrat pe câteva probleme de biologie și patologie cardiovasculară, care abia după 15-20 de ani au devenit fundamentale și prioritare

în cardiologie. De la cardiologia clinică în perioada '60-'90, s-a dezvoltat cardiologia de explorare și cea intervențională. În ultimii 5 ani, cardiologia a trecut în era cardiologiei celulare și moleculare și aceste domenii, altădată rezervate cercetătorului hiperspecializat, au devenit astăzi domenii obligatorii pentru cardiologi.
Știința înseamnă, desigur, nu numai cercetare, înseamnă și anticipare. Și conducătorii Institutului au dovedit un spirit excepțional de anticipație pentru cardiologie, pentru care trebuie să le fim recunoscători. Fiziologia și patologia endoteliului vascular, care reprezenta în urmă cu 15 ani, un domeniu al inițiaților, a constituit de-a lungul a 20 de ani, domeniul prioritar de cercetare al Institutului.
Astăzi, patologia endoteliului vascular reprezintă un element central în cardiologia modernă, în aterosclerază, în hipertensiunea arterială, în boala cardiacă ischemică. Dar, toate acestea nu ar fi fost posibile fără dăruirea totală, înalta responsabilitate științifică, calitățile de cercetător, educator și de conducător ale Profesorului Nicolae Simionescu și a Profesorului Maya Simionescu. Destinul nedrept a făcut ca Profesorul Nicolae Simionescu să nu fie prezent astăzi, dar spiritul său a rămas în Institut.
Închei prin a spune că, oricât de grele ar fi situațiile istorice, când există speranță și când există inteligență, se poate realiza ceva. Institutul și Dumneavoastră ați dovedit-o cu prisosință.

Prof. Dr. Leonida Gherasim
Spitalul Clinic Universitar - Bucuresti
1999

***

Stimată Doamnă Academician Maya Simionescu,
Onorată Asistență,

Filiala București a Societății Naționale de Biologie Celulară cinstește memoria Profesorului Nicolae Simionescu, strălucit om de știință și prestigios întemeietor de școală. Dispariția lui fulgerătoare a însemnat o pierdere ireparabilă pentru știința românească și a îndurererat profund pe toți cei care l-au cunoscut și iubit. Prin opera sa, prin ceea ce a sădit în mințile și inimile celor care i-au fost colaboratori și discipoli el rămâne și va fi mereu prezent în mijlocul lor.
Natura a fost darnică cu Profesorul Simionescu. L-a înzestrat cu o inteligență creatoare, cu o putere de muncă fără seamăn, cu o generozitate rar întâlnită. Analiza operei sale științifice nu poate fi făcută decât de specialiști, de aceea ne vom mărgini la schițarea principalelor ei momente.
Deși consemnată în peste 500 lucrări, dintre care mai mult de jumătate apărute în publicații de peste hotare, opera științifică a Profesorului Simionescu a avut la bază o concepție unitară, aceea a relației dintre structură și funcție în stare normală și patologică. Găsim aici ideea lui Goethe: „Forma nu este decât o funcție care s-a

consolidat", idee implicată în formula lui Francisc Rainer: „Anatomia este știința formei vii". În decursul celor 4 decenii în care s-au desfășurat cercetările Profesorului Simionescu au reflectat progresele uimitoare ale tehnicilor de investigație, ca și evoluția accelerată a concepțiilor teoretice ce a avut loc în biologie în ultimile etape ale acestui mileniu.

Începutul cercetărilor Profesorului Simionescu e reprezentat de studii de morfologie vasculară și angioarhitectonie publicate în perioada 1956-1960. În paralel și apoi în continuare s-au succedat cercetări de morfologie și morfopatologie endocrină. Un moment important îl reprezintă colaborarea Prof. Simionescu la cercetările Acad. Șt. Milcu asupra patologiei topochimice și ultrastructurale a gușii familiale. O altă importantă cercetare în colaborare cu Prof. Milcu privește glanda pineală și căile hemocrine și interstițiocrine ale acesteia.

O cuprinzătoare monografie publicată de o editură din Londra și NewYork sintetizează contribuția Prof. Simionescu la histogeneza cancerului tiroidian.

În perioada 1970-1979, Prof. Simionescu își desfășoară activitatea la Universitatea Yale și Rockefeller din Statele Unite. Aici, împreună cu George Palade își începe cercetările privind biologia celulei endoteliale. Acestui domeniu Prof. Simionescu îi va rămâne credincios pentru toată durata vieții sale și îi va consacra întreaga sa putere de muncă și creație. În acest domeniu el a adus strălucite contribuții care au intrat în patrimoniul internațional al biologiei și patologiei celulare. Cu tehnici remarcabile a demonstrat existența unor microdomenii diferențiate pe suprafața celulelor endoteliale, a descris particularitățile unor receptori și a urmărit transportul transendotelial al macromoleculelor.

Profesorul Simionescu a fost întotdeauna animat de dorința de a întemeia în România un centru în care studenții și doctoranzii să fie antrenați în cercetarea biomedicală. Din această idee, din acest vis a luat ființă Institutul de biologie și Patologie Celulară. În construcția, dotarea și organizarea acestui Institut a investit imensa sa putere de muncă și tot atâta experiență și creativitate. Gândit de el până în detaliile construcției și funcționalității, Institutul reflectă spiritul său ordonat și metodic. S-a confirmat încă o dată vechiul adagiu „mens agitat molem", spiritul însuflețește materia.

Echipa de cercetători formată de profesorii Nicolae și Maya Simionescu a desfășurat o cercetare de calitate ale cărei rezultate sunt recunoscute și larg citate în literatura internațională. Se realizează în continuare un program de cercetare cu laboratoare din Statele Unite. Institutul a fost reprezentat în foruri internaționale de profesorii Nicolae și Maya Simionescu în calitatea lor de „visiting professors" la universități americane și canadiene precum și prin participarea lor ca organizatori, președinți sau raportori generali la numeroase manifestări științifice internaționale.

La nivelul Institutului s-au dezvoltat în continuare lucrările asupra transportului transendotelial. Noțiunea și termenul de "transcitoză" a fost introdus în terminologia internațională ca rezultat al acestor cercetări. Într-un articol din revista „Science", în 1993, Anderson subliniază rigurozitatea științifică și valoarea argumentelor cu care Nicolae și Maya Simionescu documentează în mod definitiv fenomenul de transcitoză.

Descrierea canalelor transendoteliale precum și diferențierea segmentelor juncționale intercelulare în endoteliul vascular sunt alte contribuții importante aduse de Nicolae și Maya Simionescu în colaborare cu George Palade.

Acad. Vlad Voiculescu

***

Doamnă profesor Maya Simionescu,
Onorați oaspeți,
Stimați colegi,

Alături de întreaga spiritualitate românească, care a deplâns în această primăvară dispariția unui Eugen Ionescu, a unui Emil Cioran, medicina românească, parte integrantă a științei și culturii de pe aceste meleaguri, deplânge dispariția profesorului Nicolae Simionescu.
Eternitatea pentru Ionescu, Cioran și Simionescu începe în primăvara lui primăvara lui 1995, an care va rămâne în istorie pentru aceste pierderi irecuperabile. De ce simțim așa de acut dispariția profesorului Nicolae Simionescu? În primul rând pentru modelul de om profesionist, de intelectual. Să nu mai amintim de profesionalitatea și farmecul profesorului Simionescu. Pentru, așa cum spunea profesorul Guido Majno, pentru eroismul de a se întoarce pe aceste meleaguri dintr-o țară în care avea aproape tot ce și-ar fi dorit cineva și care i-a recunoscut din plin valoarea. Simțim profund această dispariție pentru faptul că instituția pe care a creat-o, școala, reprezintă într-adevăr ca cea mai durabilă instituție dintr-o societate cu un etalon și un standard nemaiîntâlnit la noi. Resimțim această dispariție pentru verticalitatea omului care a îndrăznit, în vremuri în care niciunul dintre noi nu îndrăznea să spună acele adevăruri. De asemenea, resimțim acut această dispariție pentru faptul că profesorul Simionescu ne-a învățat să prețuim valoarea în știință, în artă sau în literatură și nu în ultimul rând, pentru faptul că ne-a deschis calea către un nou tip de cercetare, nou pentru această țară dar mai ales nou prin ea însăși pentru că distila o viață de om, de morfolog, de fiziolog, de chirurg chiar, și ce școală de viață și de muncă este această chirurgie și iarăși nu în ultimul rînd faptul că a dedicat o viață cercetării fundamentale pentru a elucida probleme încă neabordate și cu tehnici neabordate. Iată deci un model, un om, o instituție, o școală și pentru că toate acestea trebuiau să poarte un nume, un singur nume, i s-a spus "Nicolae Simionescu", Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu". Această instituție va dăinui peste veacuri amintind de ctitorul ei, de acea lumină care a fost la începutul acestei mărețe întreprinderi. Dacă există o ironie în știință atunci cu siguranță aceasta este faptul că endoteliul acela pe care profesorul l-a studiat mai bine decât oricine este și acela care l-a răpus, probabil datorită faptului că a smuls în acest domeniu naturii mai mult decât ar fi trebuit să o facă. De la dispariția profesorului Simionescu avem totuși mângâierea că Dna profesor Maya Simionescu,

cea cu care s-au împletit idealurile, visurile și împlinirile sale, este alături de noi și avem certitudinea că va continua toate aceste visuri și idealuri făcându-le să se împlinească și mai mult. Vom fi cu siguranță alături de dânsa pentru a cinsti memoria profesorului Nicolae Simionescu. Eu personal am un motiv în plus de mângâiere, acela că este alături de mine sau sunt alături de mine Dan și Agneta Simionescu care fără îndoială poartă ceva din filonul de aur al profesorului Nicolae Simionescu. De asemenea trebuie să mărturisesc că port povara, ca exponent al chirurgiei cardiovasculare, că tot ce știm și am învățat n-am putut să oferim profesorului Simionescu pentru a fi și astăzi sau poate mulți ani de acum împreună cu noi. În ce măsură această remarcabilă instituție, pe care profesorul Simionescu a creat-o, a smuls naturii acele secrete foarte bine protejate în patologia cardiovasculară vom vedea în partea a doua a acestei sesiuni în care vor fi prezentate concepția institutului și a profesorului Nicolae Simionescu despre aterogeneză.

Vă mulțumesc.

Prof. Radu Deac

***

Dragă Doamna Maya Simionescu,

Anii petrecuți în IBPC, începând cu marile emoții ale interviului de angajare cu Dumneavoastră (unic în felul lui pentru lumea românească a acelor ani) au reprezentat o perioadă extrem de fericită pentru mine. Acolo am facut cunoștință cu adevărat cu biologia celulară și moleculară, trecând dincolo de litera cărții la experimente pe care nu mi le-aș fi închipuit posibile. Nu voi uita schimburile de replici științifice, și nu numai, din cadrul seminariilor lunilor februarie - martie, sau de la sesiunile S.N.B.C., senzația de mare familie pe care Dumneavoastră și Domnul Profesor ați creat-o după ani de zile de colaborare apropiată cu fiecare cercetător. Oricât de prețios ar suna, sunt sincer mândră că mi-ați oferit ocazia să fac parte din marea familie a IBPC-iștilor. Experiența profesională și umană dobândită în institut mi-a folosit enorm în anii de doctorat de la New York University, SUA și a atenuat incredibil de mult șocul adaptării la lumea științifică americană. În institut am legat prietenii extrem de strânse, cum se spune că numai în anii școlii se întâmplă. Dar ce altceva decât o școala a fost IBPC pentru noi toți? Oriunde m-aș afla, în viitor ca și până acum, îmi voi aminti cu nespusă placere și nostalgie de anii petrecuți în clădirea de pe Strada Hașdeu nr. 8. Și tare aș fi vrut să ne reîntâlnim cu toții, cei noi și cei vechi la acest moment aniversar. Dar cum nu a fost să fie așa, nu-mi rămâne decât să urez "electronic" Institutului, Dumneavoastră și iubiților mei colegi, La mulți ani și multe succese!

Cristina Iftode
New York University, NY, USA

AMINTIRI DIN PREZENT

Ce am primit fiecare dintre noi și purtăm cu noi în permanență indiferent în ce colț al lumii ne-au împins destinele personale? Respectul pentru munca și adevărul științific, grija pentru întreg și în egală măsură pentru amănunt și context. Am învățat ce înseamnă lucrul meticulos și corect, cum să ne comunicăm ideile și rezultatele, cât de importantă și plăcută este munca în echipă. Nu am avut senzația că venim "la lucru", lucrul era parte din întregul vieții noastre și Institutul era a doua familie. Am plâns și am râs împreună, ca orice ființă omenească copleșită uneori de prea multe poveri sau fericită pentru împliniri. Am învățat că schimbarea paradigmelor în știință cere inteligența de a observa și explica lucruri aparent improbabile și perseverența de a le impune lumii științifice cu spirit critic și luciditate. Am învățat că a-ți recunoaște greșelile și imperfecțiunile de moment nu este o rușine, ci o sursă de învățătură pentru mai târziu. Și, nu în ultimul rând, am învățat că știința înseamnă renunțare la multe, multă muncă și răbdare. Sunt, cred, lucrurile esențiale fără de care oricât de învățat ai fi, nu poți face știință de calitate pe termen lung. Șansa noastră a fost că toate aceste lucruri să ne vină sub formă de exemple de la oamenii cu care am lucrat. Ei ne-au dat mereu de-a lungul anilor putere și speranță, ne-au învățat cu dragoste și profesionalism și ne-au corectat greșelile folosind mănuși de catifea. De aceea tot ce am scris mai sus nu sunt simple învățături impersonale, ci poartă învelișul unor amintiri dragi. De aceea sunt atât de persistente și se confundă mereu cu prezentul. La toate acestea se adaugă o imagine care îmi răsare în minte nu de puține ori în diminețile când mă trezesc departe de casă: o clădire alb-roșie, cu trei etaje, însoțită de pomi și flori în care se transmit aceleași daruri și se continuă truda începută cu 20 de ani în urmă cu mintea, inimile și mâinile dragilor noștri Profesori - Maya și Nicolae Simionescu.

Dr. Anca Dobrian
1999

***

O ANIVERSARE CU ÎNALTĂ SEMNIFICAȚIE PENTRU ȘTIINȚA ROMÂNEASCĂ – 25 DE ANI DE LA ÎNFIINȚAREA INSTITUTULUI DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ „NICOLAE SIMIONESCU"

Cu 25 de ani în urmă, ilustrul cercetător, omul de știință Acad. Nicolae Simionescu, a pus bazele institutului care astăzi spre deosebită cinstire îi poartă numele.
Înființarea acestuia a însemnat o nouă treaptă în evoluția unui domeniu modern, biologia celulară și moleculară. Prin dezvoltarea sa impetuasă, condus cu măiestrie și înaltă competență științifică și organizatorică de Nicolae Simionescu, institutul s-a impus rapid în lumea științifică națională și internațională. Opera sa este continuată astăzi cu deosebit succes de cea care i-a fost colaborator apropiat, Acad. Maya Simionescu.

Pentru rezultatele ştiinţifice de o deosebită importanţă teoretică şi aplicativă Institutul de biologie şi Patologie Celulară "Niclolae Simionescu" a primit distincţia de excelenţă.
M-am apropiat de acest institut, încă de la începutul existenţei sale prin preocupările mele legate de biologia celulară, la plante. În acest mod am putut lua cunoştiinţă mai îndeaproape de obiectivele şi tematica sa.
Cercetările întreprinse în domeniul biologiei celulare a endoteliului vascular, a fenomenlor de transcitoză, descoperirea canalelor transendoteliale, studiul modificărilor endoteliului vaselor sangvine în maladiile cardiovasculare sunt câteva dintre subiectele abordate cu predilecţie în institut.
Tehnicile moderne de biologie celulară şi moleculară abordate la Şcolile de vară organizate în ultimii ani s-au bucurat de un interes aparte din partea cercetătorilor. Aşa se face că de la începutul creării sale, institutul a reprezentat o înaltă şcoală pentru numeroşi tineri însetaţi de cunoaştere şi dornici de afirmare.
Activitatea prodigioasă a institutului s-a împletit permanent cu cea a Societăţii Naţionale de Biologie Celulară şi Moleculară înfiinţate la scurt timp (în anul 1982), al cărei preşedinte a fost acelaşi neobosit şi entuziast profesor Nicolae Simionescu, iar după 1985 Acad. Maya Simionescu.
Prin sesiunile sale anuale ţintite pe probleme extrem de actuale, de larg interes ştiinţific, societatea a reuşit să polarizeze, în scurt timp toate forţele din domeniul biologiei celulare româneşti, cu referire la biologia celulară umană, animală, vegetală sau microbiană. Tematici ca: "Mecanisme celulare şi moleculare ale adeziunii celulare", "Polaritatea celulară", "Mecanisme de răspuns ale celulei la factori de agresiune: adaptare, lezare, apoptoză", "Procese moleculare ale senescenţei şi morţii celulare", "Biotehnologia la nivelul secolului XXI", ca şi nelipsitul simpozion de "Tehnici recente în biologia celulară şi moleculară" sunt subiecte puse în discuţie la aceste simpozioane.
Fiecare întâlnire constituie adevărate momente de bucurie în care ne împărtăşim deschis succesele şi neîmplinirile, găsim noi căi de rezolvare ale problemelor dificile şi plecăm de fiecare dată mai bogaţi spiritual.
Volumele publicate, „Current problems in cellular and molecular biology" şi recent „Analele Societăţii Naţionale de Biologie Celulară", „Buletinul Socetăţii Naţionale de Biologie Celulară" cuprind un mare număr de lucrări ale căror rezultate vin să îmbogăţească patrimoniul ştiinţific naţional şi internaţional.
Aniversarea a 25 de ani de existenţă reprezintă o etapă importantă în viaţa instituţiei şi a colaboratorilor săi constituind baza sigură a dezvoltării sale în continuare.
Cu modestie urez institutului, conducătorului acestuia doamna Acad. Maya Simionescu şi colaboratorilor săi deplin succes în cercetarea ştiinţifică spre propăşirea continuă a Institutului de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu".

Dr. Aurelia Brezeanu
Institutul de Biologie, Bucureşti
2004

O ALTĂ LUME

Institutul de proiectare unde lucram când am aflat de postul de la Institutul de Biologie și Patologie Celulară avea dificultăți în procurarea unor noi proiecte. Se vorbea de detașarea unora dintre noi la Pitești, așa că eram dispusă să mă mut, oarecum, oriunde.

Când am ajuns în fața institutului, nu mi-a venit să cred că așI putea avea norocul să lucrez într-o clădire atât de frumoasă și am ezitat să intru, dar pentru că tot făcusem drumul, am îndrăznit și primul om la care am fost îndrumată a fost Doamna Maya. Era în holul de la intrare, o doamnă slăbuță, cu o privire vie, îmbrăcată cu o fustă neagră cu trandafiraşi și un tricou alb cu aceeași bobocei de trandafir. M-a cucerit această prezență atât de feminină, dar am intrat în panică aflând că e soția directorului. Nu-mi amintesc tot ce am vorbit cu dânsa, dar reținc că mi se adresa foarte natural. M-a rugat să dau o probă de scris, dar îmi tremura atât de tare mâna, încât dânsa dorind să mă scoată din dificultate, m-a întrebat dacă nu am vreun desen făcut de mine sau ceva scris. Salvarea a venit de la agenda mea de telefon, ponosită, dar scrisă în momente de calm. Mi s-a adus apoi un vas de plastic pe care am scris cu un marker numărul 103, adică Laboratorul de organele, pe atunci. M-au lăsat singură, m-am liniștit și totul a ieșit bine.

Am aflat că deși dânsa mă acceptase, trebuia să merg și în audiență la Domnul Profesor. Audiențele se țineau în după-amiaza zilei următoare. Când am ajuns, era plin de oameni în hol și am fost îndrumată către secretariat, unde trebuia să confirm sosirea. Acolo era un domn sobru, impecabil îmbrăcat cu cămașă albă, sacou și cravată (era vară). Văzând așa un secretar, m-am întrebat, oare cum o fi directorul. Când am început să lucrez în institut am constatat că distinsul „secretar" nu era altul, decât Doctorul Hillebrand, care în acea după-amiază fusese de gardă. Domnul Profesor, o prezență ieșită din comun, un interlocutor ferm și totuși uman, după ce a aflat ce am lucrat până atunci, mi-a dat să desenez un suport de plastic, pe care era o rolă consumată de scotch. Am mers într-un laborator, unde mai erau două desenatoare, tot cu câte un suport în față. După ce am revenit la Domnul Profesor în cabinet, mi s-a părut corect să-i reamintesc ce salariu aveam și am comentat jenată că nu cred că-mi va putea da la fel de mult ca să desenez asemenea nimicuri. La fel de impenetrabil mi-a mulțumit și mi-a spus să aștept un răspuns acasă. Am plecat foarte descumpănită și mare mi-a fost nedumerirea când spre seară am primit un telefon prin care eram invitată să vin a doua zi să-mi iau hârtiile prin care solicitam transferul. Așa am ajuns eu la Institutul de Biologie și Patologie Celulară.

APARATUL GOLGI

Foarte curând, după sesiunea inaugurală, Domnul Profesor m-a chemat să-mi dea de lucru. Era ceva asemănător cu o celulă, era chiar o celulă cu vezicule, mitocondrii, nucleu și încă ceva. Acel "ceva" semăna cu o aglomerare de „pișcoturi", drept care l-am întrebat, dacă formațiunea aceea trebuie așa grupată. Le-am zis „pișcoturi" și

imediat am simțit că ceva nu e în regulă. Mi-a adresat o privire contrariată și m-a întrebat, cum de știu despre aparatul Golgi? Era un cuvânt cu totul nou pentru mine. M-a cuprins o panică cumplită, pe care Domnul Profesor a sesizat-o și ca să destinda atmosfera, mi-a spus că ar trebui să scriu, ca pedeapsă, de o sută de ori, cuvântul cu pricina, pe care mi l-a caligrafiat, calm, cu un creion impecabil ascuțit. A doua zi, când i-am adus desenul, aveam în mână un caiet unde scrisesem de o sută de ori aparatul Golgi.
Peste un timp am aflat că pe câinele Doamnei Maya și al Domnului Profesor îl chema Golgi.

DOUĂ SCAUNE!

Ce mă fascinase cel mai mult în atelierul meu de lucru, nu era planșeta impecabilă și mult diferită de cea plină de găuri de la pioneze, pe care lucrasem până atunci, ci scaunul cu rotile. L-am îndrăgit de cum m-am așezat pe el. Aveam două scaune cu rotile.
Într-o bună zi sosesc de la specializare din SUA doi cercetători și mă trezesc cu Lixăndrel, administratorul, că vine să-mi rechiziționeze scaunele. Când am încercat să-l înduplec să-mi lase măcar unul, mi-a replicat că e dispoziția Doctorului Neacșu. M-am simțit atunci foarte nenorocită și am început să plâng. Când suspinam eu mai cu elan, sună secretara și mă invită la Domnul Profesor. M-am spălat repede pe ochi și m-am dus. Dânsul a observat imediat că plânsesem și n-a trebuit decât o întrebare amabilă ca eu să izbucnesc iar în lacrimi. După ce a realizat amploarea "catastrofei" m-a trimis să mă liniștesc și m-a rugat să revin peste zece minute. Când am sosit a început imediat discuția despre ce aveam de lucru. La întoarcerea în atelierul de grafică, nu mică mi-a fost mirarea văzând cele două scaune tronând în mijlocul camerei.
Cinci ani mai târziu mă căsătoream cu Doctorul Neacșu.

NOCTURNE

În vremea sesiunilor rămâneam împreună cu Mihaela, după program, să terminăm ceea ce peste zi nu se putuse face. Deși mai prin toate laboratoarele găseai încă cercetători, fiecare era cufundat în treaba lui și nimeni nu ne mai deranja, iar noi două buchiseam concentrate la desenele noastre. Erau lungi perioade de tăcere acompaniate de ochestra greierilor. Într-o seară au început să ciripească niște păsărele și probabil m-a deranjat zgomotul care se suprapunea peste concertul meu preferat. Atunci am rugat-o pe Mihaela să închidă "butonul". Ea a înțeles întotdeauna ce spun, chiar dacă exprimarea mea suna ciudat pentru ceilalți. Plecam apoi spre casă amândouă și ca să ne dezmorțim încheieturile de atâta stat pe scaun, o luam prin cartierul Cotroceni și urcam pe jos până la Academia Militară. Ne îmbătam cu parfumul florilor de Maica Domnului și ne refăceam puterile pentru a doua zi.
De câte ori aud cântând greierii, trimit un gând duios serilor petrecute în atelierul de grafică din institut.

PRIMA ANIVERSARE

La împlinirea unui an de la Sesiunea inaugurală din 3 Septembrie 1979, se hotărâse ca, după Sesiunea Științifică, să sărbătorim în institut realizările unui an de muncă. Nici unul dintre noi nu știa cum trebuie să arate o astfel de sărbătoare. Deci, era aniversarea cuiva de un an, putea fi un copil, copilul Domnului Profesor, căci în mintea dânsului se născuse ideea înființării acestui institut. Am făcut rost de o păpușă, pe care am îmbrăcat-o în bebeluș. Apoi au început să curgă ideile. Bebelușul a fost așezat într-un leagăn. Doamna Moldoveanu i-a brodat pe babetică sigla institutului. Ca puiul nostru să nu flămânzească, la prima lui aniversare, i-am pus lângă el două biberoane, unul cu Serotonină, altul cu Feritină, două substanțe cu care lucrase Ina Heltianu pentru a pune în evidență receptorii la histamină. Nu știam cum vor primi Doamna Maya și mai ales Domnul Profesor gluma noastră. Au fost amuzați de idee și ne-au rugat ca bebelușul să rămână în institut. La aniversările ulterioare, veneau mândri, purtând între dânșii mascota institutului.
Pe primul lui tort am desenat cu frișcă sigla. A fost o petrecere de neuitat.
Peste 15 ani, adăugam pe siglă inițialele N.S.

LA PAISPREZECE ANI

Conform tradiției, după Sesiunea Științifică, în fiecare an, urma o petrecere în familie. Sărbătoarea se ținea în „octocel" celula octogonală din aluminiu și sticlă, care adăpostea o parte din postere. Panourile erau împinse cât mai mult spre pereții celulei și în mijloc se puneau măsuțe pliante și scaune. Toată lumea aducea bunătăți și abia așteptam să fie lăudate și realizările noastre culinare.
Acum institutul împlinea 14 ani, așa că în comitetul nostru de organizare am gândit că e momentul să-i oferim un buletin de identitate ca oricărui cetățean. La capitolul părinți, Maya și Nicolae Simionescu.
Am făcut cocarde la acea aniversare. S-a citit prezența după condica din septembrie 1979.
Pe pereții din sticlă apăruseră altfel de postere, cu alte realizări decât cele profesionale. Acolo erau trecute numele tuturor copiilor care se născuseră de la înființarea institutului, erau enumerate familiile celor care se cunoscuseră în institut, precum și a celor care-și întemeiaseră o familie cu cineva din afara institutului.
Pentru prima oară însă, Domnul Profesor a întârziat la o întrunire. Nimeni nu știa ce se întâmplă. Adriana, secretara dumnealui, era mută și foarte abătută. La un moment dat, a apărut zâmbitor, și-a cerut scuze pentru întârziere, s-a bucurat de surprizele pregătite, dar mai tot timpul a stat sprijinit de unul din stâlpii din centrul octocelului. Era palid. S-a retras mai repede ca alte dăți, dar a rămas cu noi Doamna Maya. N-am aflat nimic în ziua aceea, abia mai târziu, am auzit că îl necăjea inima.

INSTITUTUL MEU

Institutul meu și al tuturor celor care-l poartă în inima lor este o clădire modernă, dar sobră, cu spații generoase și ferestre mari ca să pătrundă cât mai multă lumină,

căci e nevoie de ea atât fizic, cât și metafizic.
Între pereții lui m-am simțit onorată de a lucra, dar și protejată de impostură și prostie. Am trăit alături de colegii mei, implicați în cercetare, dorința de cunoaștere, plăcerea competiției și satisfacția rezultatelor. Am fost o mică rotiță în acest mecanism magic care creează specialiști și aduce totodată contribuții esențiale științei în domeniul biologiei celulare, dar unde s-au cizelat caractere și s-au deschis noi orizonturi celor care s-au lăsat prinși în vibrația unică a unor oameni deosebiți: Doamna Maya și Domnul Profesor.
Aceasta este singura clădire pe lângă care atunci când trec, retrăiesc cu emoție cele mai multe realizări ale mele și știu că, în intimitatea ei va sălășlui întotdeauna o parte a sufletului meu.

Corina Neacșu
2004

***

SFÂRȘITURI DE AN ÎN IBPC

După ce viața științifică a început să pulseze în institut și se cristalizase un colectiv de „lucrători științifici" formați din înăuntrul și din afara țării (prin bursele obținute de Profesor la diferite institute de profil din lume), activitatea în acest „stup" al cercetării în ale biologiei celulare a căpătat un caracter deosebit: se formase o comuniune familială ce cuprindea în efervescența trăirilor entuziaste și membrii familiei fiecăruia care nu erau pe "statul" de plată al institutului.
Aniversările de nume, după dorința „conducerii", se făceau prin „grija" celor care erau sărbătoriți, iar Crăciunul și Anul Nou prin „adunare generală", cuprinzând toți membrii familiei, inclusiv cei care nu erau încă la grădiniță.
An de an, Pomul de Crăciun (alias de Iarnă) aduna în jurul său și al lui Moș Crăciun (cu barbă și costum adecvat), toată suflarea schemei institutului - inclusiv însoțitorii de acasă ai fiecăruia - în frunte cu organizatorii și sponsorii de bază: Profesorul și Doamna Maya.
Se spuneau glume, scheciuri, pamflete și chiar un plugușor, care purta pecetea anului care se termina.
Se „petrecea" sufletește și gastronomic corespunzător entuziasmului culinar al exponentelor feminine din schemă și nu numai. Se trecea din an în an cu pasarea ștafetei de dragoste și omenie spre consolidarea tânărului echipaj al instituției ce purta sigla IBPC... astăzi și "Nicolae Simionescu".

Dr. Constantin Neacșu
2004

***

AMINTIRI LA UN SFERT DE VEAC – IBPC NS 1979 - 2004

Suntem dintre cei care cunosc (și recunosc) din proprie experiență caracterul unic al Institutului, dat de modul cum a fost conceput, organizat și condus, în intenția de a-i forma pe membrii săi ca oameni de știință. Activitatea de laborator, seminariile, discuțiile periodice, redactarea lucrărilor, simpozioanele internaționale, activitățile culturale - toate au avut marca personalităților inconfundabile ale creatorilor lui. Fiind totdeauna alături, ei și-au pus amprenta de savanți, de profesori și de oameni de cultură pe Institut, adică pe noi cei care am avut șansa de a lucra acolo.

E foarte greu să alegem acum între miile de amintiri care ne leagă de acele zile de aur ale Institutului. Dar să luăm, de exemplu, examenele de doctorat (de admitere sau colocviile). Pentru noi, candidații, pregătirea acestor examene a fost ca a doua universitate, confirmând misiunea Institutului de a fi nu numai o unitate de cercetare de nivel mondial, dar și una de învățământ, la același nivel. Ni s-a dat mult și ni s-a cerut mult. Au fost trei elemente care au contribuit la asta: (a) Programa, care a facut o acoperire excelentă a biologiei celulare, văzută dinlăuntrul ei, ca de cei care au contribuit la însăși formarea disciplinei; (b) Biblioteca, dotată cu revistele și tratatele de bază ale domeniului; (c) "Sala de consiliu", unde s-au putut consulta publicațiile de ultimă oră, o colecție impresionantă de reprinturi cerute de noi prin „Current Contents", într-o vreme când puțini oameni de știință din Europa de est abia auziseră de acest sistem de informare. În particular, un mare impact credem că l-a avut folosirea ca referință a manulalului „Molecular Biology of the Cell" de Alberts et al., până azi nedepășit decât de re-editările lui îmbunătățite. De aceea, fiecare examen a fost pentru noi o sărbătorare, căci ne justifica dedicarea unei cantități apreciabile de efort lecturii și studierii lui „Alberts". Aceste ocazii ne creau o imensă satisfacție, deoarece puteam să înțelegem un mare număr de lucruri, despre care aflam de ce sunt așa cum sunt. De asemenea, iluminante erau pentru noi erau examenele orale, adevărate dialoguri unde învățam despre subiecte mai mult chiar decât spuneam!

În Institut se muncea serios, dar se și… juca serios! Mai puțin în pauze, dar cu siguranță în „programul" de tenis de câmp inițiat chiar de domnul Profesor și de doamna Maya. Așa ne-a adus în conștiință nevoia exercitiului fizic și a relaxării mentale, atât de necesare vieții moderne, dar atât de străine spiritului de înregimentare socialist. Terenurile selecte de la „Tenis Club", atmosfera destinsă, neprotocolară, unde am întrezărit dimensiunile umane atât ale colegilor noștrii, cât și ale familiei Simionescu. Ne stimulau și înclinațiile speciale pentru tenis ale lui Mugurel Badea și ale lui Victor Jinga, care povesteau despre mirifice terenuri și meciuri amicale de peste ocean, în vremea șederii lor în America.

S-a întâmplat odată că nici unul din colegii noștrii nu a venit la tenis într-o duminică dupa-amiază, decât eu (N.M.). Domnul Profesor și doamna Maya au venit însă. Obișnuiam să jucăm la dublu și inainte, dar acum situația era destul de incomodă pentru mine. Eu eram un începător, care făcea ce-i stătea în putință de unul singur, ceea ce nu însemna prea mult: alergam mult pe teren, nu cu prea mare folos, dar

făceam față. Domnul Profesor a realizat că va fi dificil pentru mine, dar a vrut probabil să mă încerce. M-a întrebat dacă vreu să joc și am acceptat provocarea. Era o împrejurare când eram testat dincolo de capacitățile mele obișnuite. Am simțit că domnul Profesor vrea să îmi dea o lecție, să îmi arate că dacă am încredere că pot, voi reuși, și să nu mă las intimidat de situație, care era destul de jenantă pentru mine (ținând cont de timiditatea mea înnăscută). Spre mirarea și încântarea mea, jocul a mers bine. Curând m-am încălzit și simțeam că „dau" din mine mai mult ca de obicei, nu atât cât credeam eu că pot, ci atât cât domnul Profesor îmi cerea. Mă simțeam din ce în ce mai bine și cred că n-a fost o partidă slabă. Dar mesajul a fost clar pentru mine: "Crezi că poți și vei putea!".

Ce bine era daca aș fi pus asta în practică de atunci… Dar mai târziu, m-am amintit de această împrejurare de multe ori. Domnul Profesor mi-a pus în mână cheia sucessului (și) pe terenul de tenis; rămânea doar să o folosesc, la timpul potrivit.

O altă împrejurare, asemănătoare, a fost legată de ieșirea la ski, la Poiana Brașov. Învățasem să skiez de curând, și, din nou, activitatea era o solicitare dincolo de domeniul obișnuitului. Domnul Profesor și doamna Maya erau printre noi și ne urmăreau atenți. Pe pârtia de la Drumul Roșu, am trecut de câteva ori zburând ca vântul. Poate m-aș fi oprit în vreun brad, dar gândul ca „iată, e alt test pe care e bine să-l trec și că pot să-l trec" ("dacă și Profesorul crede asta!") mi-a dat siguranță. Și, într-adevăr, domnul Profesor a părut plăcut surprins de cum skiam, pentru că, eram, evident un începător, dar curajul ținea locul experienței și mi s-a părut că apreciază asta în mod deosebit. Celor ce eram pe pârtie la ora aceea ne-a spus „zmei" și ne-am simțit mândri de asta. Încă o dată, domnul Profesor își exersa charisma formătoare, arătându-ne chiar prin propriile noastre confruntări cu necunoscutul și cu pericolul ceea ce are, într-adevăr, valoare.

Domnul Profesor era uneori, mai ales în ultima perioadă, preocupat și îngândurat. Simțeam că pe umerii săi stăteau grave probleme ale științei, ale administrației și ale politicii și, poate, ale sănătății. Asta îl făcea să pară distant câteodată, dar am am avut prilejul să mă conving că asta nu era decât o aparență. Într-o după-amiază am fost programat la o discuție în biroul dumnealui (cel nou). Cred că avea să-mi spună, sau să mă întrebe ceva despre organizarea unei comemorări, ca de exemplu cea a lui Brâncuși, sau poate a unei zile a Institutului; nu mai știu. Dar îmi amintesc ca acum, că după subiectul propriu-zis, domnul Profesor nu m-a „expediat", ci a început să-mi povestească altele, tot legate de cultură. Mi-a spus de exemplu, ce mult îi place să asculte „Concertul pentru vioara" de Bruckner și despre faptul că în viață a scris și chiar a publicat literatură, sub pseudonim… Până azi am rămas cu dorința de a afla care au fost acele cărți (sau poezii?) și care a fost numele lui de literat…

Printre multe alte momente remarcabile din acea vreme, întoarcerile în țară ale Profesorului și doamnei Maya din America, unde mergeau în fiecare an pentru un semestru universitar, erau adevărate evenimente. Mergeam să-i așteptam la aeroport după Anul Nou, cândva prin ianuarie. Pentru noi, cei ne-ieșiți din țară, însuși aeroportul era ceva misterios, chiar periculos. Securitatea mișuna peste tot și paza strictă arăta

cât de mult „lagărul socialist" era de fapt, un lagăr!
Ceea ce ne-a uimit și ne-a încântat întodeauna era caă domnul Profesor și doamna Maya reveneau, cu regularitate de anotimp, în lagăr. Ne era și nouă clar că o faceau din ce în ce mai greu, dar trăiam cu sentimentul că, de fapt, noi reprezentam familia lor lărgită și întoarcerea la București era pentru dânșii de două ori o întoarcere acasă… Și nu veneau niciodată cu mâna goală: cadourile noastre erau tonele de chimicale, de instrumente și mai ales de cărți și de reviste, care reprezentau adevăratul „combustibil" al Institutului, pe ani de zile. Alt combustibil nu prea aveam: înghețam în hainele de ski în Institut, pentru că se „tăiase" căldura, încât precipitau soluțiile cu SDS în tampoanele de electroforeză…! Iar dr. Sampath Parthasarathy care venise la unul din simpozioane, l-a întrebat pe Aurelian Radu pe Calea Victoriei, seara, în taxiul de la aeroport: "Am ajuns oare în București…?". Gândindu-se poate la acest întuneric, când ne-a revăzut la aeroport, doamna Maya a oftat: "Dacă ați vedea cum sunt pomii de Crăciun în America… Câte lumini, câtă feerie!".
Ne gândim acum, că poate dorința unora dintre noi de a lucra în Occident a fost (desigur, involuntar) cultivată de aceste adevărate spectacole ale revenirii. Multe lucruri pe care le-am auzit de la dânșii, atunci și cu alte ocazii, ne-au stârnit curiozitatea. Dar când am ajuns dincoace de Ocean, am putut cunoaște realitatea, nu așa de grozavă peste tot. Ne-am spus apoi de multe ori, cu naiva uimire, că lucrurile "vai, nu sunt ca în Institut"! Căci Institutul a rămas și va fi întodeauna pentru noi, sistemul de referință.
Da, viața merge înainte, ca vârful copacului care crește. Dar se poate desprinde vreodată vârful de rădăcini?

Nicanor și Leni Moldovan
Davis Heart and Lung Research Institute
Ohio State University, Columbus, OH, USA.

***

Onorată Asistență,
Stimați Colegi,
Dragi Prieteni,

Astăzi, la ceas aniversar, copleșiți de emoție, reînviem din cotloane ascunse ale sufletului calde amintiri din anii tinereții, ce s-au împletit în mod fericit cu existența acestui Institut. Aducem astfel, recunoștința noastră tuturor celor care cu fermitate dar și cu blândețe, ne-au călăuzit pașii pe drumul, adesea anevoios, al vieții, omagiind o dată în plus, prin prezența noastră, memoria Profesorului Nicolae Simionescu, ilustră personalitate a științei românești.
Singurul lucru care imi da curajul sa ma adresez D-voastră, acum și aici, este sentimentul că mă aflu printre ai mei, acasă, în sânul unei mari familii, ai cărei membri,

si-au lasat pentru cateva ceasuri preocuparile cotidiene și s-au adunat pentru a cinsti prin prezenta lor acest lăcaș.
Spun asta cu convingerea că fiecare dintre cei ce au ținut să fie azi de față, la ceas aniversar, păstrează în amintire Institutul mai mult decât ca pe un simplu loc de muncă. Cu toții simțim încă vie căldura sufletească pe care acesta o emană. Ne leagă de el nu doar nostalgia tinereții, ci și faptul că într-un fel sau altul, pentru fiecare dintre noi, întâlnirea cu Institutul reprezintă un punct ce ne-a marcat destinul.
O vorbă veche spune că „omul sfințește locul". Este prefect adevărat, dar eu cred și în reciprocitatea acestei teorii. Cred că și locul poate sfinți oamenii, îi poate înnobila, îi poate face mai puternici, mai serioși, mai buni, mai generoși. Un astfel de loc e Institutul de Biologie și Patologie Celulară, ce poartă astăzi in semn de respect și prinos de recunoștință numele unuia dintre cei doi ctitori ai săi: Prof. Nicolae Simionescu. Aici, de-a lungul a 25 de ani s-a creat nu doar știință. S-au făurit destine.
Acest "lăcaș de cultură în care se face știință", așa cum inspirat îl definea Profesorul, s-a născut din vise și speranțe și a fost pus în operă cu pasiune, inteligență și o muncă neobosită. Și, de aceea, el nu se putea limita doar la creația științifică. Mai presus de orice, el a modelat OAMENI cu caractere puternice, creând punți de legătură inter-umană.
O paranteză: vorbeam acum câteva zile cu D-na Maya și, mai în glumă, mai în serios, i-am spus că în Institutul nostru s-a descoperit nu doar ABP-ul - Albumin Binding Protein, adică proteina care leagă albumina, ci și probabil PBP-ul - People Binding Protein, adică proteina care creează punți de legatură între oameni.
Alături de zestrea genetică, de educația primită în familie și în școală, în desăvârșirea personalității individului, un rol deosebit îl are atmosfera de la locul său de muncă. Prin intermediul, ei un om își poate descoperi valențe nebănuite, își poate accentua sau remodela trăsăturile pozitive sau, din contră, pot ieși la iveală trăsături latente ce urâțesc firea umană.
Cu măiestrie de bijutieri, cei doi mentori ai noștrii, Dl. Profesor și D-na Maya Simionescu au șlefuit caracterele tuturor celor ce le-au fost aproape, dându-le străluciri de diamant. Bineînteles că numărul karatelor a ținut de fiecare dintre noi în parte.
Puterea exemplului personal, perseverența și plăcerea cu care reușeau să-și depășească propriile standarde, din ce în ce mai ambițioase, și-au pus în mare măsura amprenta și asupra noastră, a celor ce timp de atâția ani le-am fost colaboratori. Seriozitatea și respectul reciproc au reprezentat un model pe care ni l-am însușit cu totii, aplicându-l nu doar în relațiile profesionale, ci și în cele de familie.
Am păsit pragul acestui institut la vârsta de 19 ani, venită direct de pe băncile școlii. Pentru tinerii de azi, ce au la dispoziție Internetul și zeci de canale de televiziune, șocul nu mai poate fi același. Dar pentru o adolescentă, în 1979, în plină eră comunistă, impactul a fost colosal. Obișnuită cu peisajul anost al clădirilor vechi și sobre ale Facultăților de Biologie și Medicină Veterinară (unde făcusem practica în timpul liceului), intimidată de clădirea impunătoare a Facultății de Medicină, intrarea în

clădirea din aluminiu și sticlă a Institutului mi-a tăiat răsuflarea, mi-a dat sentimentul că am patruns într-o altă lume, într-o altă țară. Dar șocul nu s-a oprit aici. Denumirea primului laborator pe care l-am văzut scris pe o ușă m-a uluit: „Citofarmacologie". Nu îmi venea să cred. Aspectul laboratoarelor, aparatura, halatele cu sigla institutului, toate îmi păreau a fi frânturi din documentarele de la „Teleenciclopedia". Totul mă copleșise și nu mi-aș fi închipuit vreodată că voi putea ajunge să lucrez aici.

Mi-am depus cererea de angajare, dar mi s-a spus să revin în ianuarie, pentru că Dl. Profesor Simionescu și D-na Maya Simionescu plecaseră în America și urmau să se întoarcă abia peste 3 luni. Pentru mine acest fapt era de-a dreptul halucinant. Cum se putea ca niște oameni odată plecați în AMERICA, să se mai întoarca... în ianuarie. De ani de zile bunicii și parintii mei ascultau „Europa liberă" și „Vocea Americii" și știam că, cine reușește să plece acolo, nu se mai întoarce niciodată.

Și, totuși, în ianuarie... cei doi s-au întors. S-au întors, pentru că aici era împlinirea visului lor.

Pentru mine a urmat apoi interviul cu Dl. Profesor Nicolae Simionescu. Atitudinea sa, plină de jovialitate și condescendență, m-au făcut să depășesc emoțiile primului meu interviu. Acest moment a reprezentat pentru mine trecerea graniței dintre adolescență și maturitate. Am simțit pentru prima dată ce înseamnă să fii luat în serios și ce înseamnă să-ți asumi o responsabilitate.

Au trecut 25 de ani de atunci! La scara istoriei nu este decât un fir de nisip pe țărmul mării. Dar pentru o viață de om înseamnă foarte mult. E o perioadă ce practic se confundă cu tinerețea mea, cu prieteniile, puține, dar trainice, legate în acești ani, a căror trăinicie nu au putut-o știrbi nici timpul și nici distanțele.

Sunt 25 de ani în care dintr-un copil, am devenit pe rând soție și mamă a trei minunate fete, reușind să trec cu dinții strânși peste inerentele obstacole ale vieții. Am încercat, urmând exemplul minunatului cuplu format de ctitorii acestui institut, să îmbin viața de familie cu cea profesională. E o rețetă care, aplicată cu seriozitate, dă rezultate pe ambele planuri.

În incheiere, dar nu în ultimul rând, aș dori să subliniez colaborarea cu totul specială cu D-na Maya Simionescu, clădită pe un imens respect și o mare admirație, pentru care întotdeauna am considerat, că nici un efort nu este prea mare și față de care se îndreaptă toată dragostea și recunoștința mea.

Vă mulțumesc și aștept să ne revedem la Aniversarea a trei decenii de activitate.

Marilena Daju

***

GÂNDURI SCRISE SAU SPUSE...

DESPRE CELULĂ

„Celulele reprezintă Universul redus la esență de la care societatea ar avea multe de învățat. Înțelepciunea la care te îndeamnă este respectarea sinelui și, în același timp, respectarea „celuilalt", conviețuire în armonie".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„Există multe pilde pe care le capeți studiind viața celulelor. Cu cât le studiez mai îndeaproape, cu cât cred că le înțeleg mai bine, mă uimesc formulele directe și regulile simple cu care, cele trei miliarde de celule ale corpului uman, își desfășoară funcțiile răspund provocărilor mediului înconjurător, se adaptează, evoluează, se divid și, în final, mențin viața. Am învățat că celulele organismelor vii în timpul a milioane de ani de evoluție, prin mijloace simple, au reușit ceea ce societatea umană se străduie să reușească, anume să viețuiască, să comunice și să se dezvolte în armonie ele între ele și, în același timp, cu mediul înconjurător. Celula, unitatea fundamentală a vieții, a găsit mecanisme înțelepte prin care să acomodeze entități aparent opuse: armonia între unitate și diversitate, între identitate și cooperare, între identitate și integrare".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„Am convingerea că celula este pacientul secolului XXI".
(Maya Simionescu)

„Cercetările (in biologia celulară, n.r.) au dus la înțelegerea faptului că „celula este sediul vieții și al bolii" și când vom înțelege pe deplin limbajul celulelor, vom câștiga bătălia împotriva acestor boli ucigătoare (boli cardovasculare, n.r.)".
(Maya Simionescu, Ziua – 10 ianuarie 2005)

DESPRE CERCETĂTORI

„Ideea curioasă pe care o auzi uneori că noi am putea fi importatori și beneficiari ai rezultatelor obținute în alte țări, în afară că umilește inteligența românească, nu este posibilă, deoarece utilizarea creației științifice o pot face doar cei pregătiți în domeniu."
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„Cercetătorii veritabili sunt, după mine, o speță aparte. Ce vor ei? În primul rând, condiții de lucru, tehnologie modernă, aparatură performantă, modalități de informare, cum sunt abonamente la reviste științifice, acces la cărti publicate în edituri internaționale, internet, posibilitatea de a-și prezenta rezultatele la congrese naționale și internaționale, de a publica în reviste științifice (care deseori cer taxă de publicare). În al doilea rând, și foarte important, ei cer condiții de viată demne (în

traducere: salarii)".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„Domnilor, vă rog nu umiliți inteligența românească! Nu umiliți eforturile unor oameni care prin liberă alegere stau în România și mai ales fac tot ce pot să producă știință bună. Nu-i ignorați pe aceștia".
(Maya Simionescu, Curentul – 8 octombrie 2001)

„Lumea se globalizează azi. Dar pentru știință, asta s-a întâmplat de mult. Știința nu are granițe naționale, dar fiecare națiune are nevoie de știință, pentru că știința nu se poate importa sau chiar cea care se importă trebuie să fie întâmpinată de oameni pregătiți. De aceea, eu mă uit cu smerenie la toți cei care nu se sperie, nu se blazează și continuă să mențină pe mapamond știința românească".
(Maya Simionescu, Curentul – 8 octombrie 2001)

„Vedeți că mă refer mereu la cercetătorii veritabili. Ca și în alte domenii, lumea științei este poluată de neaveniți și nechemați. Cred că trebuie găsit un mecanism social prin care aceștia să fie distribuiți unde se potrivesc. Ne trebuie un sistem de criterii și un grup de evaluatori care, cu blândețe intransigentă să pună cercetătorii și proiectele de cercetare pe o reală scară ierarhică a valorii".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„... dăruirea cercetătorior (de la IBPC, n.r.) a întreținut o stare de spirit în care să te bucuri pentru ce ai descoperit și te strădui ca în fiecare zi să înțelegi lumea în general și lumea dinăuntrul nostru în particular, propriile noastre celule".
(Maya Simionescu, Ziua – 20 septembrie 2004)

„...cercetătorul nu umblă pentru recunoaștere publică, umblă pentru cunoaștere, iar când o găsește, chiar în parte, simte nevoia să o comunice în publicații științifice, iar când se acumulează multe date, ele sunt uneori adunate într-o carte".
(Maya Simionescu, Ziua – 10 ianuarie 2005)

DESPRE CERCETARE

„Cercetarea științifică este mai mult decât o profesie, este un mod de a trăi, cu strădanii reușite alături de încercări nereușite, iar între ele marea agitată a îndoielilor care te invită la înțelepciune. Iar în lupta dintre bucuria succeselor și amăreala eșecurilor, principalul instrument de conservare rămâne pasiunea".
(Nicolae Simionescu)

„În viitorul apropiat, știm înspre ce ne îndreptăm, dar nu știm ce vom găsi… Am elaborat planuri, dar nu și predicții, pentru că, în realitate, dacă lucrurile ce vor fi găsite vor fi într-adevăr noi, ele sunt prin definiție necunoscute azi. Suntem tonifiați de fiecare observație nouă și, în același timp fericiți că suntem atât de ignoranți încât să facem din fiecare zi, când reintrăm în laborator, o confruntare cu propriul nostru intelect."
(Nicolae Simionescu - 1980)

„Cercetarea este un act de creație care, pe lângă neliniștea căutătorului, cere și liniștea actului în sine. Pentru liniștea mentală a cercetătorului este necesară asigurarea condițiilor respectabile de trai și un statut social potrivit funcției lui. Ce se poate face? Cred că este important ca cei care iau hotărâri pentru destinele cercetării românești să evalueze bine dorințele și putințele noastre. Eu cred că, în condițiile României de azi, este greu să faci cercetare performantă, dar nu este imposibil! Societatea (mă rog, statul) trebuie să sprijine cercetarea fundamentală și în special cercetarea fundamentală direcționată, care, cu siguranță, mai repede sau mai încet, devine baza fără de care nu se poate dezvolta bine, cercetarea aplicativă. Fără cultură (prin cultură înțelegând și știință) nu se poate imagina dezvoltarea societății".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„Până la urmă, ajungem la fondurile alocate cercetării și, egal de important, la distribuirea lor. Cu cât fondurile sunt mai mici, distribuirea lor este mai importantă. Există o masă critică de finanțare a unui proiect de cercetare. Sub această masă critică, fondurile care se dau unui proiect sunt o risipă, deoarece cu ele nu poți realiza proiectul și se risipesc fără nici o finalizare. Dacă unui proiect de cercetare, care ar costa 200 milioane de lei, îi dai un grant de 20 milioane, realizarea lui nu are nici o șansă".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„Știința începe cu o întrebare și aceasta este continuată de o mare curiozitate intelectuală. Dacă întrebarea este importantă și curiozitatea te neliniștește, dacă ai înțelepciunea și șansa să alcătuiești o echipă de cercetători talentați, genuin interesați în știință, dacă muncești fără încetare, dacă te chinuie un rezultat pe care nu-l înțelegi decât dacă mai faci încă 20 de experiențe care cer alte șase luni de lucru, dacă te culci seara cu o idee și accepți a doua zi că nu a fost ideea cea mai bună și o iei de la capăt cu aceeași dorință, dacă accepți eșecurile și reușitele cu același calm și determinare, rezultatul final al cercetării tale poate fi foarte bun".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„Cred că va veni momentul când în discursul politic o să apară și cuvântul "cercetare", alături de educație și învățământ și când se va înțelege că finanțarea cercetării fundamentale nu este o subvenție, ci o investiție pentru un viitor mai bun

al societății... Un cercetător și o cercetare bună costă scump, dar un cercetător și o cercetare mediocră costă cu mult mai mult".
(Maya Simionescu, Ziua – 9 mai 2005)

„Grant-urile sunt o formă bună de finanțare a proiectelor de cercetare științifică. Ele se folosesc de multă vreme în lume, iar la noi în țară au fost introduse pentru prima oară în Academia Română de către acad. Nicolae Simionescu. Primite cu multă reticență la început, ele au fost apoi preluate atât pentru finanțarea cercetării din învățământ, cât și pentru cercetare aplicativă".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„Filizofia de bază este ca cercetătorii să vadă, să creadă și să se convingă de faptul că lucrează într-un proiect important, că rezultatele lor bune sunt apreciate de comunitatea științifică națională și internațională, că insuccesele în știință sunt multe, dar nu descurajatoare, că ceea ce nu înțelegi azi, mâine ar putea să devină limpede, că ei fac parte dintr-o lume uneori neînțeleasă, dar o lume plină de fascinația descoperirii "necunoscutului" care există în jurul nostru sau chiar în noi înșine. Dacă reușești să faci asta ani și ani la rând, să transmiți neliniștea căutării și bucuria găsirii, dacă perseverezi în credința cercetării, ai șansa să creezi o "școală științifică"".
(Maya Simionescu, Ziua – 9 mai 2005)

„Cercetarea este un act de creație. Cere libertate! Descoperirile nu se pot comanda; în cercetare știi ce cauți, dar nu ce vei găsi, fenomenele noi sunt prin definiție necunoscute. Înveți în timp să tratezi egal cei doi "ínamici": bucuria succeselor și amărăciunea eșecurilor".
(Maya Simionescu, Jurnalul Național - 24 februarie 2009)

„Cred că cercetarea științifică de calitate și cercetătorii genuini, veritabili, sunt o avuție națională. Bogăția unei țări se măsoară în primul rând, cred eu, prin talentele și valorile cu care contribuie la patrimoniul cultural național și universal. Cercetarea științifică la noi este, în bună parte, de valoare, dar la ora actuală se află foarte aproape de marginea supraviețuirii. Aceasta este trist și inacceptabil pentru un popor cultural".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

DESPRE MENTORI ȘI TINERI

„Rolul profesorului, ctitor de școală, mi se pare asemănător cu rolul părinților în primii ani de viață. Nu cred că trebuie să facă nimic special, ci doar să-și ducă existența firesc și să se lase observat. Rolul principal este să croiască un drum, să vadă ceea ce este important și să ofere tinerilor posibilitatea de a-l urma. De fapt, să ofere o paletă largă de probleme, de întrebări, de șanse dintre care tinerii să-și poată alege ce li se

potrivește, ce le place".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

„N. Simionescu și G. Palade au fost modelele după care mi-am format propriul meu mod de a gândi știința. Încerc și eu să fiu un model pentru tineri (fără să dau lecții) și să le arăt prin propria mea existență că le trebuie idei, cutezanță, putere de muncă și încredere pentru a nu dezerta în fața insuccesele inerente cercetării".
(Maya Simionescu, Jurnalul Național - 24 februarie 2009)

DESPRE ȘTIINȚĂ

„Știința în România nu a ajuns la statutul pe care-l merită deoarece sunt unii care din incompetență ignoră știința și pe cei care o slujesc. Mai mult, alții contestă rolul cercetării, și îndeosebi a celei fundamentale în progresul socio-economic, în felul acesta condamnând ceea ce nu înțeleg. De aceea, în aceste vremuri, comunitatea științifică trebuie să iasă din pasivitate și să-și impună punctele de vedere pentru a schimba mentalitatea organelor de decizie".
(Nicolae Simionescu, 1994)

„Democrația nu înseamnă populism și politicianism declarativ. Democrația implică competență, responsabilitate și intelocrație".
(Nicolae Simionescu, 1994)

„Cercetarea este efortul intelectual cel mai creator de care omul este capabil. În istoria omenirii, nevoia de cunoaștere a apărut ca o trăsătură definitorie a ființei umane. În lupta cu natura, omul a trebuit să caute sau să creeze mijloace de adaptare, apărare sau atac. Astfel, cunoașterea din curiozitate a fost ulterior arbitrar definită "cercetare fundamentală", iar cunoașterea generată de nevoia de soluții a fost, într-un sens foarte larg, numită cercetare aplicativă. Această taxonomie este larg criticabilă, iar folosirea acestor termeni operaționali în politica științei a creat și creează încă dificultăți și uneori erori în soluții".
(Nicolae Simionescu, 1984)

„....cercetarea fundamentală în biomedicină are prin obiectul ei - omul - cea mai aplicativă dintre cercetări deoarece se adresează omului ca fiind nu numai pateticul nostru capital, dar neîndoielnic unicul producător al oricărei alte cercetări".
(Nicolae Simionescu, 1984)

„Investiția constantă în științele de bază și în formarea noii generații de scientiști este cea mai lucidă și mai sigură investiție în viitor".
(Nicolae Simionescu, Academica - 1994)
„Generația „biologică" (calendaristică) se dovedește, în unele cazuri, a fi neesențială,

cum este exemplul unor eminenți oameni de știință, ca Prof. Ștefan Milcu sau Prof. G. E. Palade (și exemplele sunt numeroase). Beneficiari ai unei structuri biologice și intelectuale de excepție, prin felul în care gândesc și acționează ei au aparținut și aparțin în continuare generației științifice tinere, de avangardă. Cât de relativ este impactul generației biologice asupra performanțelor profesionale se poate vedea și în strălucitele exemple din alte domenii, ca cele ale artei și culturii (P. Picasso, P. Cassals, A. Rubinstein, A. Horowitz etc.)".
(Nicolae Simionescu, 1994)

„Știința mare este generată de întrebări mari și de setea de răspunsuri la marile întrebări ale cunoașterii, răspunsuri care odată obținute vor genera noi întrebări și mai profunde… Năzuința biologilor celulari spre adevărul științific este o izbândă a adevărului în general de care societatea noastră are atâta nevoie…".
(Nicolae Simionescu)

„…finanțarea corespunzătoare a Cercetării Fundamentale nu apare ca un lux, ci ca cea mai potențial productivă investiție în inteligența românească".
(Nicolae Simionescu)

„...Orice minte informată, știe că nu se poate sconta pe un progres economic fără sprijinirea cercetării fundamentale…".
(Nicolae Simionescu)

„...Știința este parte a culturii, iar ...Cultura înseamnă deopotrivă trei lucruri: creație, asimilare și transmitere de valori".
(Nicolae Simionescu, 1989)

„...să ne aducem aminte de minunații cărturari și oameni de știință ai țării noastre care, în vremuri grele, au știut să găsească resursele spirituale și fizice pentru a crea asociații și societăți științifice și culturale ce au modulat hotărâtor istoria social-politică și culturală a țării".
(Nicolae Simionescu, 1982)

„...să înțelegem obligația ce ne revine de a lăsa generațiilor viitoare un început de drum".
(Nicolae Simionescu, 1982)

„Să vorbim azi de o ecologie a culturii la care avem datoria de a participa activ pentru identificarea și combaterea surselor de poluare și a gravelor efecte pe care le pot avea asupra purității și viabilității moștenirii spirituale pe care o transmitem viitoarelor generații".
(Nicolae Simionescu, 1989)

„De ce sunt atât de importante pentru noi caietele lui Eminescu? Pentru că ele reflectă o imensă sete de cunoaștere pentru tot: filozofie, filologie, economie, istorie, etc… caietele lui conțin zeci de pagini de adnotări de biologie, chimie, fizică, matematică. Comemorându-l pe Eminescu, reiterăm îndemnul, adresat îndeosebi tineretului nostru, pentru încredere în geniul creator al poporului român și năzuința activă spre o formare complexă".
(Nicolae Simionescu, 1989)

DESPRE ACADEMIE

„Academia este o parte și o emanație a cercetării științifice. În primirea de noi membri, Academia Română ar trebui să fie ca Janus, zeul roman patron al tuturor începuturilor dar și al tuturor sfârșiturilor – cu o față să privească înapoi spre creatorii de știință și cultură de ieri, pe care să-i consacre – cu cealaltă față să scruteze înainte pentru a identifica mințile tinere creatoare, capabile să ducă mai departe pe o orbită superioară viitorul acestei Academii".
(Nicolae Simionescu, 1994)

„Viata academică, în general, și a Academiei noastre, în special, este cunoscută și recunoscută de cine vrea să o cunoască, cine se apleacă cu spiritul liber și linistea gândului bun și își ia răgazul să observe. Acești observatori corecți văd că, în condiții deloc simple, în Academia Română de azi, trecutul, prezentul și viitorul culturii noastre (știință și arte) au devenit un proiect central, al cărui obiectiv este restalibirea ordinii firești a valorilor noastre, a bogatului nostru patrimoniu național".
(Maya Simionescu, Curentul – 26 martie 2001)

IMPOSIBILUL NU EXISTĂ

Gânduri de viitor

- Institutul să dăinuie și să continue drumul ascendent început în urmă cu 30 de ani;
- Tinerii cercetători să se lase seduși de farmecul ascuns al cercetării și să se împlinească descoperind secretele naturii cu pasiune, cutezanță, determinare și onestitate.

- ...regret că nu am răgazul și nici talentul să scriu o carte despre „imposibilul nu există".

ACADEMICIAN MAYA SIMIONESCU
Director al Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu"
Co-fondator al Institutului

Romanian Academy
School of Advanced Studies of the Romanian Academy
Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"

PhD THESIS SUMMARY

Heterogeneity, functionality and therapeutic potential of neutrophils in myocardial infarction

SCIENTIFIC SUPERVISOR:

Acad. Maya Simionescu

PhD STUDENT:

Cristina-Andreea Mihăilă

Bucharest

2025

CONTENTS

List of abbreviations and symbols.....9

Introduction.....13

PART I

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

1. NEUTROPHIL BIOLOGY AND FUNCTIONS.....19

1.1. Origin and development of neutrophils.....21

1.2. Role of neutrophils in the inflammatory response.....24

1.2.1. Neutrophil recruitment to the inflamed area.....24

1.2.2. Functions of neutrophils at the site of inflammation.....31

1.2.2.1. Degranulation and cytokine production.....31

1.2.2.2. Phagocytosis.....33

1.2.2.3. Generation of reactive oxygen species (ROS).....35

1.2.2.4. Neutrophil extracellular trap (NET) formation.....36

1.3. Involvement of neutrophils in atherosclerosis.....39

2. PATHOPHYSIOLOGY OF MYOCARDIAL INFARCTION.....42

2.1. Etiology and epidemiology of myocardial infarction.....42

2.2. Phases of cardiac repair after myocardial infarction.....43

2.2.1. Inflammatory phase.....45

2.2.2. Proliferative phase.....53

2.2.3. Maturation phase.....57

3. NEUTROPHIL INVOLVEMENT IN MYOCARDIAL INFARCTION.....59

3.1. Effects of neutrophils on myocardial tissue.....59

3.1.1. Role of neutrophils in the inflammatory phase.....59

3.1.2. Role of neutrophils in the repair phase.....60

3.2. Neutrophil heterogeneity and plasticity.....61

3.3. Neutrophil-macrophage interaction.....64

3.4. Neutrophil-based therapeutic strategies.....65

3.4.1. Direct targeting of neutrophils (Ly6G, CXCR2, GSDMN).....66

3.4.2. Targeting factors released by neutrophils (ROS, S100A9, MPO, NET) 68

PART II

ORIGINAL CONTRIBUTIONS

1. IDENTIFICATION OF NEW SPECIFIC MARKERS, SIGNALING MECHANISMS AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF N1 AND N2 POLARIZED NEUTROPHILS; THE IMMUNOMODULATORY EFFECT OF BLOCKING S100A9 ON N1 NEUTROPHILS.....73

1.1. Introduction and objectives.....73

1.2. Materials and methods.....75

1.2.1. Animal model.....75

1.2.2. Neutrophil isolation and polarization.....75

1.2.3. mRNA sequencing in polarized neutrophils.....77

1.2.4. Differential expression analysis.....79

1.2.5. Analysis of differentially expressed genes (DEGs).....79

1.2.6. Quantitative analysis of gene expression by Real-Time PCR.....80

1.2.7. Analysis of cytokines and chemokines in the neutrophil-conditioned medium using Proteome Profiler Array.....81

1.2.8. Evaluation of protein expression in neutrophil-conditioned medium by ELISA.....82

1.2.9. Quantification of reactive oxygen species.....82

1.2.10. Analysis of the energy profile of N1 and N2 neutrophils.....82

1.2.11. Analysis of the chemotactic capacity of polarized neutrophils.....83

1.2.12. Assessment of MMP-9 gelatinolytic activity by zymography.....83

1.2.13. Analysis of protein expression by Western Blotting.....84

1.2.14. Detection of myeloperoxidase (MPO) and nitric oxide (NO).....84

1.2.15. Statistical analysis.....85

1.3. Results.....85

1.3.1. N1 and N2 neutrophils subtypes exhibit distinct transcriptional profiles.....85

1.3.2. Validation of N1 neutrophil presence in in vivo models of acute inflammation..90

1.3.3. Blocking S100A9 reduces gene expression of myeloid chemotactic molecules CCL2, CCL3, and CCL5 in N1 neutrophils.....93

1.3.4. Quantification of soluble molecular mediators of the immune response released by N1 and N2 neutrophils.....94

1.3.5. Functional evaluation of N1 and N2 neutrophil subtypes.....95

1.3.5.1. ROS and NO production.....95

1.3.5.2. Energy profile of N1 and N2 neutrophils.....96

1.3.5.3. MPO and MMP-9 activity in polarized neutrophils.....97

1.3.5.4. Transmigration of polarized N1 and N2 neutrophils.....98

1.3.6. Signaling mechanisms activated in polarized neutrophils.....99

1.3.6.1. NADPH oxidase subunits regulate ROS production in pro-inflammatory neutrophils (N1).....99

1.3.6.2. Protein kinases and transcription factors activated in polarized N1/N2 neutrophils.....100

1.4. Discussion.....102

1.5. Partial conclusions.....106

1.6. Study limitations.....107

2. INVESTIGATION OF THE CAPACITY OF N2 NEUTROPHILS TO INDUCE MACROPHAGE POLARIZATION INTO A REPAIRING PHENOTYPE (MERTK+).....108

2.1. Introduction and objectives.....108

2.2. Materials and methods.....110

2.2.1. Isolation and polarization of neutrophils.....110

2.2.3. Experimental model.....111

2.2.4. Gene expression analysis by Real-Time PCR.....111

2.2.5. Protein expression analysis in N1/N2 neutrophils and macrophages supernatants using ELISA.....113

2.2.6. Protein expression analysis in cell lysates by Western Blotting.....113

2.2.7. Induction of apoptotic cardiomyocytes and apoptosis assessment by Flow Cytometry.....114

2.2.8. Immunofluorescence analysis of MerTK with an important role in efferocytosis.....114

2.2.9. Analysis of macrophage efferocytosis capacity by immunofluorescence...115

2.2.10. Statistical analysis.....115

2.3. Results.....115

2.3.1. Factors released by N1/N2 neutrophils differentially modulate inflammatory/anti-inflammatory markers in macrophages.....115

2.3.2. Macrophages exposed to N2 neutrophil-secreted factors upregulate receptors involved in apoptotic cell recognition.....119

2.3.3. Linker molecules MFG-E8 and Gas6 are expressed by macrophages exposed to the N2 neutrophil secretome....121

2.3.4. Signaling pathways triggered by N1/N2 neutrophil-secreted factors in macrophages....123

2.3.5. Macrophage efferocytosis capacity is enhanced by factors released by N2 neutrophils....125

2.4. Discussion....127

2.5. Partial conclusions....131

2.6. Study limitations....131

3. INVESTIGATION OF THE EFFECT OF THERAPY WITH N2 NEUTROPHIL-RELEASED FACTORS IN MYOCARDIAL INFARCTION IN A MOUSE MODEL WITH MYOCARDIAL INFARCTION....133

3.1. Introduction and objectives....133

3.2. Materials and methods....135

3.2.1. Obtaining the N1 and N2 neutrophil secretome....135

3.2.2. Surgical procedure for inducing myocardial infarction and injection of the concentrated secretome from N1/N2 neutrophils....136

3.2.3. Evaluation of gene expression of inflammatory and pro-fibrotic markers by Real-time PCR....138

3.2.4. Histological and immunohistochemical analysis of mouse hearts with myocardial infarction....139

3.2.5. Determination of secreted proteins of IL-6, MCP-1, S100A8/A9 and TGF-β in mouse plasma by ELISA....140

3.2.6. Quantification of circulating extracellular DNA....140

3.2.7. Statistical analysis....140

3.3. Results....141

3.3.1. Neutrophil infiltration of the myocardium on the first day post-myocardial infarction correlates with increased levels of circulating extracellular DNA and inflammatory molecules.....141

3.3.2. Effect of N1/N2 secretome injection on post-myocardial infarction tissue repair.....143

3.4. Discussion.....148

3.5. Partial conclusions.....149

3.6. Study limitations.....150

GENERAL CONCLUSIONS.....151

REFERENCES.....155

Keywords: myocardial infarction, N1/N2 neutrophils, S100A9, macrophages, neutrophil secretome, efferocytosis

Total number of pages: 174

Number of figures in the "Current state of knowledge" section: 11

Number of figures in the "Original contribution" section: 40

Number of tables in the "Original contribution" section: 5

Number of bibliographic references: 189

Articles published in ISI-indexed journals: 10

- As first author: 3
- As co-author: 7

Oral presentation at scientific events: 1

Posters presented at scientific events: 7

- national: 4
- international: 3

Patents: 1

PhD fellowship funded by the Romanian Academy (SCOSAAR): 2020–2023

Research projects – as a team member: 5

INTRODUCTION AND SCIENTIFIC OBJECTIVES OF THE THESIS

In recent decades, myocardial infarction (MI), commonly known as a "heart attack," has garnered increasing attention in cardiovascular research due to its high rates of morbidity and mortality, coupled with the limited therapeutic options available. This serious condition results from the sudden interruption of blood flow to a part of the heart muscle, most often caused by a blood clot that blocks a coronary artery, leading to a reduced oxygen supply to the myocardium. Prolonged oxygen deprivation can cause the death of heart cells (cardiomyocytes) and necrosis of cardiac tissue, events that trigger an acute inflammatory response. This response is essential for clearing away dead cells and initiating tissue repair processes (Ojha & Dhamoon, 2023). Despite significant advances in pharmacological therapies and minimally invasive procedures, the incidence of heart failure continues to increase following myocardial infarction (Sun et al., 2023).

The immune system plays a crucial role in post-infarction evolution, and neutrophils — recently identified as heterogeneous cells and the body's first line of defense (Kraus & Gruber, 2021) — are actively involved both in amplifying the inflammatory response (N1 neutrophils) and in initiating tissue repair processes following myocardial infarction (N2 neutrophils) (Ma et al., 2016). The recent discovery of neutrophil heterogeneity, particularly the two main subpopulations — N1 and N2 — has underscored the need for further research to more accurately characterize their transcriptional and functional profiles.

In this context, the primary aim of the present thesis was to characterize, both transcriptionally and functionally, the neutrophil subpopulations involved in the inflammatory phase following myocardial infarction, as well as to evaluate, both *in vitro* and *in vivo*, the therapeutic potential of anti-inflammatory N2 neutrophils. The identification of clinically relevant neutrophil subpopulations may improve the diagnosis of specific conditions and/or aid in the development of innovative therapeutic strategies.

The main scientific objectives of the doctoral thesis were: i) Identification of new specific markers, signaling mechanisms and functional characteristics of N1 and N2 polarized neutrophils; the immunomodulatory effect of S100A9 blockade on N1 neutrophils; ii) Investigation of the ability of N2 neutrophils to induce macrophage polarization into a reparative phenotype (MerTK+); iii) Investigation of the effect of therapy with factors released by N2 neutrophils in a mouse model of myocardial infarction.

The doctoral thesis is structured in two main parts. The first part, titled "**Current state of knowledge**," analyzes the specialized literature relevant to the research topic. It consists

of three chapters that cover essential aspects of neutrophil biology and function, the pathophysiology of myocardial infarction, and the role of neutrophils within this pathological context. The second part, titled "**Original contributions**," presents the experimental work conducted and the results obtained from this research. This section is divided into three distinct studies.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Neutrophils, also known as polymorphonuclear leukocytes, are the body's first line of defense, playing a key role in promoting the innate immune response (Kraus and Gruber, 2021). They are formed in the bone marrow and are released into the circulation after maturation, being stimulated by pathogens and inflammatory signals that facilitate their migration to sites of infection or tissue damage. At the site of infection, neutrophils exert their defense functions through a series of coordinated mechanisms, which include the production of reactive oxygen species (ROS) through the activation of NADPH oxidase, the release of cytotoxic components from granules, and the formation of extracellular traps (NET) (Kumar and Dikshit, 2019).

Although long considered a homogeneous population with conserved phenotype and function, recent evidence suggests the existence of neutrophil heterogeneity, with distinct functional phenotypes, both in healthy individuals and in pathological conditions, including cancer, infections, and autoimmune or inflammatory diseases (Hong, 2017; Silvestre-Roig et al., 2019). This diversity of neutrophil populations is characterized by differences in lifespan, cytokine release, surface protein expression, antibacterial responses, as well as pro-inflammatory, pro-angiogenic, or immunosuppressive functions (Hong, 2017; Silvestre-Roig et al., 2019; Fridlender et al., 2009; Denny et al., 2010).

In a murine model of myocardial infarction, two subpopulations of myocardial-infiltrating neutrophils have been described: pro-inflammatory (N1) and anti-inflammatory (N2) neutrophils. N1 cardiac neutrophils, isolated on the first-day post-MI, during the inflammatory phase, display high levels of pro-inflammatory markers (CCL3, IL-1β, IL-12a, and TNF-α). In contrast, N2 neutrophils, isolated on days 5 and 7, during the repair phase, express anti-inflammatory markers, such as CD206 and IL-10. *In vitro*, polarization of neutrophils with lipopolysaccharide (LPS) and interferon-γ (IFN-γ) for N1 or interleukin-4 (IL-4) for N2, resulted in the expression of N1/N2-specific markers, similar to those identified *in vivo* (Ma et al., 2016). Discovering the role of different neutrophil subtypes in

promoting or resolving inflammation could have significant therapeutic relevance, allowing selective targeting of a specific subpopulation to modulate disease progression.

After myocardial infarction, neutrophils reaching the infarcted area facilitate the infiltration of monocytes from the blood, which differentiate into macrophages and contribute to the removal of cardiac tissue debris and apoptotic cells, leading, in turn, to the activation of repair pathways necessary for cardiac remodeling (Prabhu and Frangogiannis, 2016). While innate immune cells play a crucial role in cardiac healing, an unbalanced or exaggerated immune response after MI, as well as defective plasticity of these cells, can exacerbate tissue damage and subsequently trigger maladaptive remodeling (Nahrendorf et al., 2010; Schloss et al., 2016).

In the ischemic myocardium, macrophages demonstrate a remarkable degree of plasticity and are intricately involved in both inflammatory and reparative processes (Nahrendorf, 2018). Macrophages are commonly classified into two distinct groups, classically activated – M1 macrophages (inflammatory) and alternatively activated – M2 macrophages (anti-inflammatory), although the phenotypic profile of cardiac macrophages is much more diverse. While M1 macrophages are mainly involved in phagocytosis and exacerbation of inflammation (Shapouri-Moghaddam et al., 2018), M2 macrophages stimulate tissue repair and regeneration and have efferocytic, pro-fibrotic and pro-angiogenic properties (Shrivastava and Shukla, 2019). Therefore, the direction of polarization of macrophages post-IM plays a crucial role in the resolution of inflammation, tissue regeneration, and the wound healing process (Kloc et al., 2019).

Given the crucial importance of pro-healing M2 macrophages in the cardiac healing process in the reparative phase, targeting neutrophils to the N2 subtype could represent a promising therapeutic strategy post-myocardial infarction (Mihaila et al., 2024).

ORIGINAL CONTRIBUTIONS

Scientific objectives of the thesis:

Objective 1: Identification of new specific markers, signaling mechanisms, and functional characteristics of N1 and N2 polarized neutrophils; immunomodulatory effect of S100A9 blockade on N1 neutrophils;

Objective 2: Investigation of the ability of N2 neutrophils to induce macrophage polarization into a reparative phenotype (MerTK+);

Objective 3: Investigation of the effect of therapy with factors released by N2 neutrophils in a mouse model of myocardial infarction.

Research methodology:

Both *in vitro* and *in vivo* techniques were applied in the three studies. *In vitro*, methods for isolation and polarization of murine and human neutrophils, co-cultures with macrophages, as well as functional tests such as efferocytosis, flow cytometry, ELISA, qRT-PCR, Western blot, histology, immunohistochemistry, metabolic analyses (Seahorse), cell transmigration analyses (xCELLigence) and transcriptomic analyses (mRNA sequencing) were used. *In vivo*, a murine model of myocardial infarction obtained by ligation of the left anterior descending coronary artery was implemented, which was administered secretome from murine neutrophils polarized towards the N1 and N2 phenotypes, in the infarcted area.

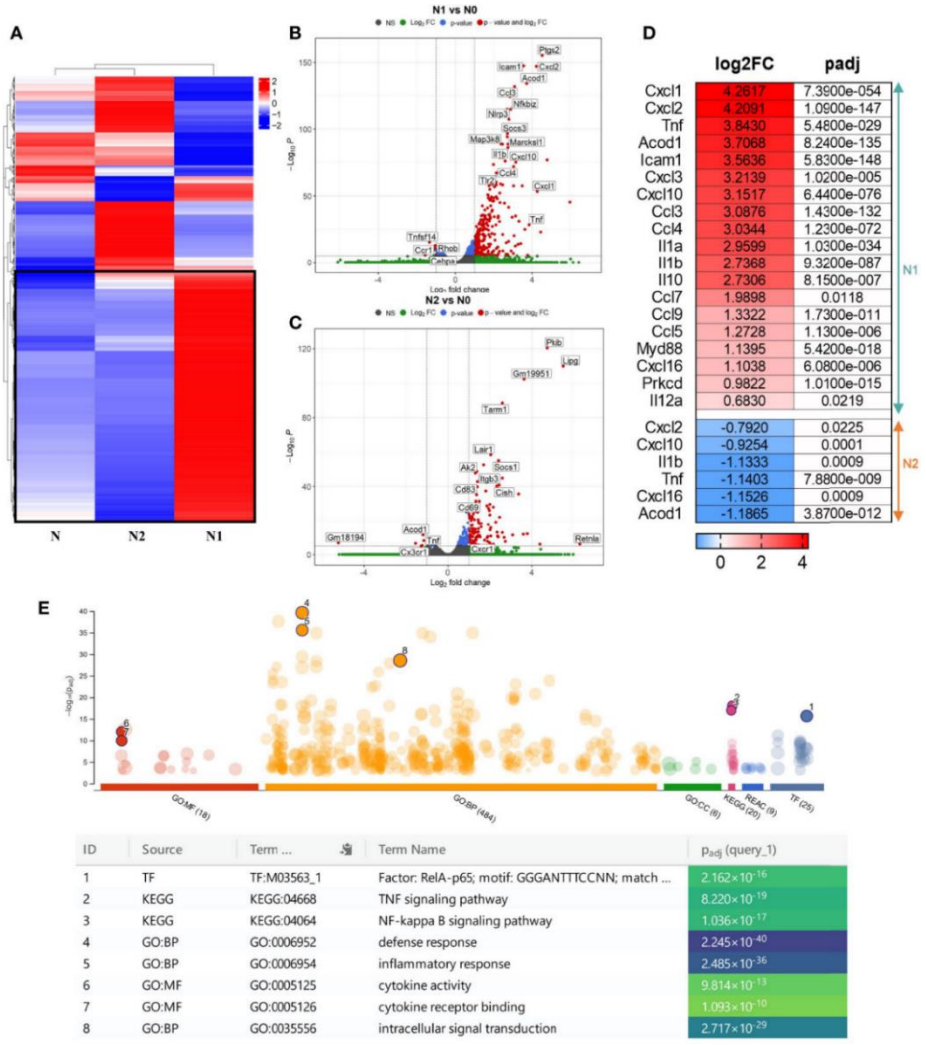
CHAPTER 1

IDENTIFICATION OF NEW SPECIFIC MARKERS, SIGNALING MECHANISMS, AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF N1 AND N2 POLARIZED NEUTROPHILS; IMMUNOMODULATORY EFFECT OF S100A9 BLOCKADE ON N1 NEUTROPHILS

The first study in the *Original Contributions* section aimed to identify new specific markers, signaling mechanisms, and functional characteristics of N1 and N2 polarized neutrophils. This study had two main objectives: (i) to perform a comparative analysis of the genotype, phenotype, and function of N1 and N2 neutrophils and (ii) to investigate the impact of blocking the S100A9 molecule with ABR-238901 on the functions of the two neutrophil subpopulations.

To achieve this, murine neutrophils were isolated from the bone marrow of the tibia and femur. They were then polarized into the N1 phenotype using lipopolysaccharide (LPS) and interferon-gamma (IFN-γ), and into the N2 phenotype using interleukin-4 (IL-4). These polarization conditions reflect the N1/N2 neutrophil phenotypes observed *in vivo* in infarcted hearts (Ma et al., 2016). Unstimulated neutrophils were used as a control group. The results of the mRNA sequencing analysis revealed distinct transcriptional and functional profiles for the N1 and N2 neutrophil populations. In the case of N1 neutrophils, 966 differentially expressed genes were identified compared to the control group. Out of these, 771 genes showed increased expression while 195 genes exhibited decreased expression. For N2

neutrophils, 532 differentially expressed genes were detected, with 408 genes upregulated and 124 genes downregulated (***Figure 1***).



ID	Source	Term ...	Term Name	p_{adj} (query_1)
1	TF	TF:M03563_1	Factor: RelA-p65; motif: GGGANTTTCCNN; match ...	2.162×10^{-16}
2	KEGG	KEGG:04668	TNF signaling pathway	8.220×10^{-19}
3	KEGG	KEGG:04064	NF-kappa B signaling pathway	1.036×10^{-17}
4	GO:BP	GO:0006952	defense response	2.245×10^{-40}
5	GO:BP	GO:0006954	inflammatory response	2.485×10^{-36}
6	GO:MF	GO:0005125	cytokine activity	9.814×10^{-13}
7	GO:MF	GO:0005126	cytokine receptor binding	1.093×10^{-10}
8	GO:BP	GO:0035556	intracellular signal transduction	2.717×10^{-29}

Figure 1. Gene expression profile of different neutrophil subsets. *(**A**) Heatmap analysis of hierarchical clustering for N, N1, and N2 neutrophils. This analysis was conducted on the log2 (FPKM+1) values of differentially expressed genes across all comparison groups. The color coding represents different expression levels: red indicates high expression, while blue indicates low expression. A major cluster of differentially expressed genes (DEGs) that are upregulated in N1 is highlighted within a black square. (**B, C**) Volcano plots showing differential gene expression between N1/N2 neutrophils and N neutrophils. Red dots indicate genes that are significantly upregulated or downregulated, with an adjusted p-value (adjP) < 0.05 and a Log2 fold change (Log2FC) > 1. In the comparison of N1 vs. N neutrophils, 771 genes were found to be upregulated and 195 genes downregulated. In the comparison of N2 vs. N neutrophils, 532 genes were upregulated and 124 genes were downregulated. (**D**) A heatmap displaying the log2 fold change and adjusted p-values for selected inflammatory cytokines and chemokines that are differentially expressed in either N1 neutrophils (upper panel) or N2 neutrophils (lower panel). Red indicates upregulated genes, whereas blue indicates downregulated genes. (**E**) Manhattan plot illustrating the results of cluster enrichment*

analysis of genes significantly upregulated in N1 compared to N and N2 neutrophils. Functional terms are grouped and color-coded by data source, i.e. molecular function (MF) in red, biological processes (BP) in orange, cellular components (CC) in green, KEGG in pink, and TRANSFAC in dark blue. Numbered terms are detailed below the plot with their respective adjP values (Mihaila et al., 2021).

To identify the molecular mechanisms responsible for the activation towards a pro-inflammatory phenotype of neutrophils, experiments were performed that aimed at blocking S100A9, an alarmin abundantly expressed by neutrophils and that signals by binding to TLR4 and RAGE receptors. Thus, N1 and N2 neutrophils were polarized in the presence of ABR-238901, a specific inhibitor of the S100A9 molecule. The results showed that N1 neutrophils display a pro-inflammatory phenotype, characterized by increased release of inflammatory cytokines and chemokines, generation of high levels of ROS and NO, an increased oxidative burst, increased activity of the enzymes MPO and MMP-9, as well as an accentuated chemotaxis (***Figure 2***).

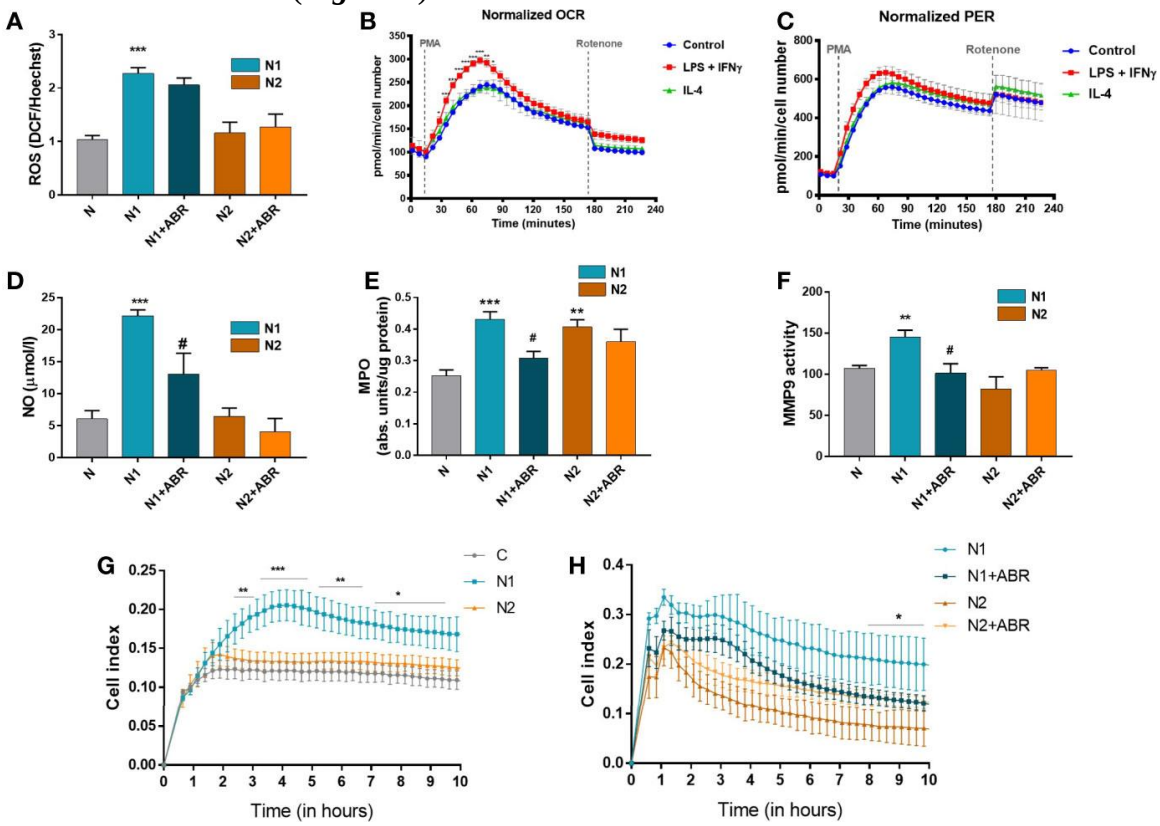


Figure 2. Functional analysis of neutrophil populations. Cells were treated for 18 h with LPS + IFNγ (N1) or IL-4 (N2) in the presence or absence of ABR-238901 (ABR). (A) *Quantification of intracellular ROS using the DCFDA assay. (**B, C**) Measurement of the neutrophil oxidative burst assessed in response to PMA: (**B**) oxygen consumption rate (OCR) and (**C**) glycolytic proton efflux rate (PER), calculated using extracellular acidification rate (ECAR) measurements. (**D**)*

*Quantification of NO released in the conditioned medium of neutrophil subtypes. (**E**) Evaluation of MPO enzymatic activity in cell lysate of neutrophil populations. (**F**) Quantification of MMP-9 gelatinase activity assessed by SDS-PAGE zymography in neutrophil conditioned medium. (**G, H**) Chemotactic activity of neutrophil populations toward IL-8 assessed using CIM-plate 16 and the xCELLigence RTCA DP system; each experiment consisted of pooled neutrophils from at least 5 mice. Data are presented as mean change from control ± SE (n = 4). Statistical significance is presented as *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, #p ≤ 0.05 (Mihaila et al., 2021).*

In contrast, N2 neutrophils display an anti-inflammatory phenotype, with increased expression of the markers CD206, Ym1 and Arg 1 (***Figure 3***), having similar levels of ROS, NO, oxidative burst and chemotactic response to unstimulated (control) neutrophils (***Figure 2***).

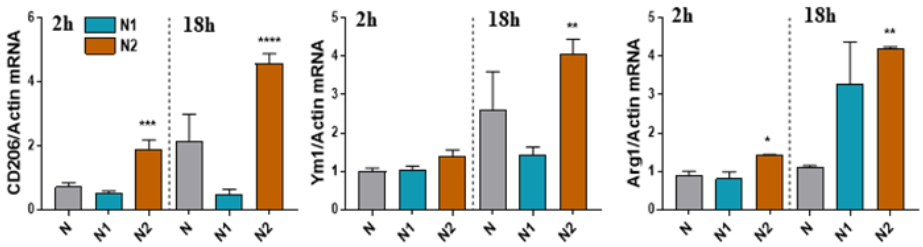


Figure 3. Gene expression of anti-inflammatory markers in neutrophils polarized for 2 or 18 hours with LPS+IFNγ (N1) or IL-4 (N2). *qPCR for anti-inflammatory markers: IL-10, CD206, Ym1 and Arg1, in N1, N2 and N. n = 5, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 (N1 or N2 vs. N) (Mihaila et al., 2021).*

We also found that the phosphorylated forms of ERK1/2 and p65, signaling molecules that are associated with the inflammatory phenotype, are significantly increased in N1, but not in N2 neutrophils, and blocking S100A8/A9 decreases the phosphorylation of these proteins, which leads to a decrease in the production of chemokines CCL2, CCL3 and CCL5 (***Figure 4***), to a decrease in the activity of NO, MPO and MMP-9, as well as to a slower transmigration of N1 neutrophils towards the chemoattractant IL-8 used (***Figure 2***).

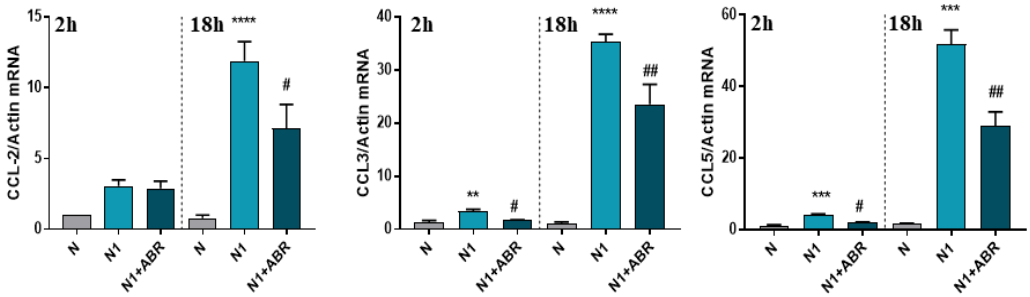


Figure 4. Gene expression of inflammatory markers in neutrophils polarized for 2 or 18 hours with LPS+IFNγ (N1) or IL-4 (N2). *qPCR for inflammatory markers: CCL5, CCL2, in N1 and N2*

*compared to control neutrophils (N). (n = 5, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 (N1 or N2 vs. N) (Mihaila et al., 2021).*

CHAPTER 2

INVESTIGATION OF THE ABILITY OF N2 NEUTROPHILS TO INDUCE MACROPHAGE POLARIZATION INTO A REPARATIVE PHENOTYPE (MERTK+)

The second study aimed to investigate the reparative capacity of N2 neutrophils to induce macrophage polarization towards a reparative phenotype (MerTK+) and had three main objectives: (i) evaluating the effect of mediators released by neutrophil subtypes on macrophage phenotypic modulation, (ii) determining the impact of N1/N2 neutrophils on macrophage erythrocytosis, and (iii) investigating the molecular mechanisms involved in macrophage reprogramming.

In this regard, murine neutrophils isolated from bone marrow were polarized into N1 and N2 subtypes for 2 hours. After this stimulation period, the initial medium was replaced with a medium without stimulators, and the cells were maintained in culture for another 18 hours. At the end of the incubation time, the conditioned media (secretome), containing the factors released by N1/N2 neutrophils, were collected and used to treat macrophages obtained by differentiation of monocytes from the THP-1 cell line. Analysis of macrophages exposed to the N1/N2 neutrophil secretome revealed a dynamic response, with them adopting different phenotypes. Thus, the secretome from N1 neutrophils favored a pro-inflammatory response of macrophages, similar to M1 macrophages, evidenced by the increased expression of pro-inflammatory markers such as TNF-α, IL-1β, and S100A8/A9. In contrast, factors released by N2 neutrophils induced an increased expression of the anti-inflammatory markers CD206, TGF-β, and IL-10 in treated macrophages, suggesting that this secretome induces an M2-type phenotype, associated with the resolution of inflammation and tissue repair.

qRT-PCR analysis revealed that macrophages exposed to N2 neutrophil secretome showed increased expression of receptors known to be involved in efferocytosis – MerTK, CD36, CXCR1, and integrin αV/β5 (***Figure 5***) – as well as of the bridging molecules MFG-E8, Gas6 and protein S, which mediate the binding of these receptors to phosphatidylserine on the surface of apoptotic cells. The phosphorylated forms of ERK1/2 and p38 MAPK proteins were analyzed by Western blotting to investigate the signaling mechanisms activated by mediators released by neutrophils in macrophages. The results indicated that

ERK1/2 was activated in macrophages exposed to N2 secretome, while pp38MAPK was downregulated.

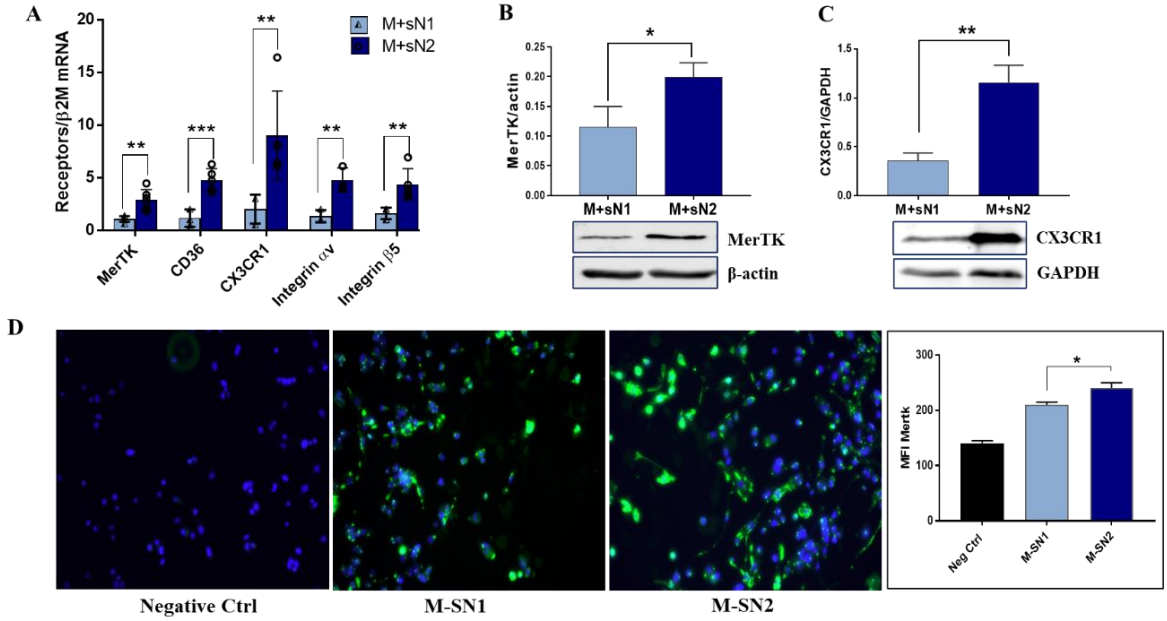
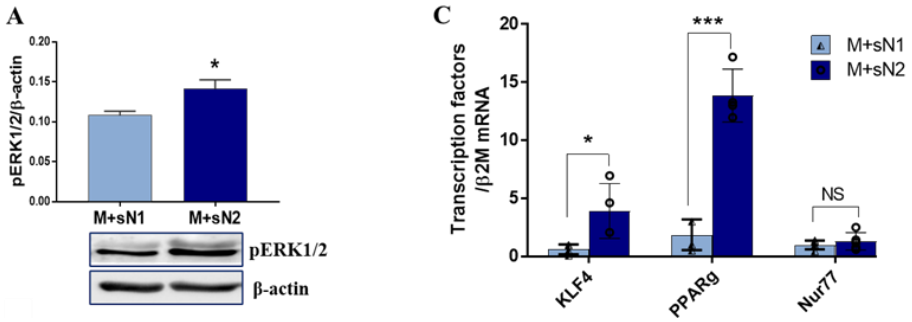


Figure 5. Factors released by N2 neutrophils induced the increase of macrophage efferocytosis receptors. (A) *Gene expressions of MerTK, CD36, CX3CR1, integrin αV, and β5 in macrophages exposed to secretome collected from N1 (M + sN1) or N2 (M + sN2) neutrophils. (**B, C**) Protein expressions of MerTK and CX3CR1 in lysates of M + sN1 and M + sN2 macrophages. Data represent the mean ± SD of three different experiments; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (M + sN1 versus M + sN2). (**D**) Representative images of MerTK surface expression on macrophages exposed to N1/N2 secretome, by immunofluorescence staining with green (MerTK) and cyan (DAPI-cell nuclei), as well as the mean fluorescence intensity (MFI) quantification graph (Mihaila et al., 2021).*

Furthermore, gene expression of the transcription factors PPARγ, KLF4, and Nur77 was increased in macrophages exposed to the N2 secretome compared to macrophages exposed to the N1 secretome, suggesting a distinct regulation of macrophage phenotype depending on the type of neutrophils secreting mediators (***Figure 6***).



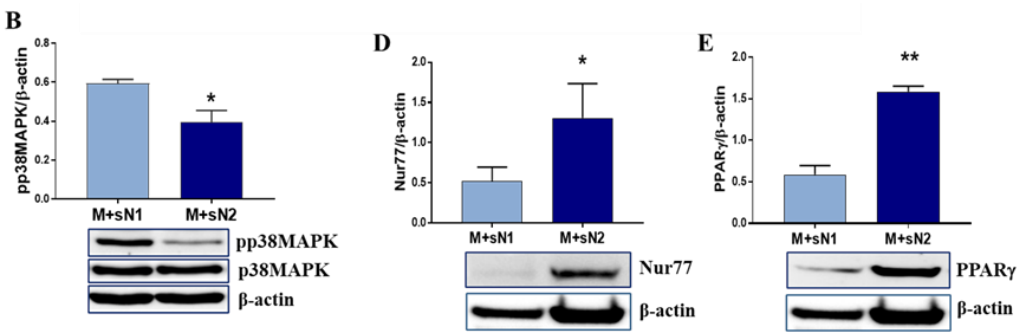


Figure 6. The signaling mechanism triggered by N2 mediators activated ERK1/2 and macrophage repair-associated transcription factors. ***(A, B)*** *Western blot analysis showed that pERK1/2 and pp38MAPM were differentially activated in N1/N2 neutrophils. The densitometric analysis results are shown as means ± SD (n = 3).* ***(C)*** *KLF4, PPARγ, and Nur77 mRNA expressions in macrophages after incubation with N1/N2 neutrophil secretome. The relative mRNA expression is shown as means ± SD (n = 3).* ***(D, E)*** *Western blot analysis of Nur77 and PPAR-γ transcription factors in macrophages exposed to N1 or N2 neutrophil secretome. The densitometric analysis results are shown as means ± SD (n = 3). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (Mihaila et al., 2021).*

Also, the data obtained in the second study demonstrated that factors released by the anti-inflammatory subset of neutrophils (present in the post-MI repair phase) induce a pro-healing macrophage phenotype, with increased efferocytosis activity, as shown by immunofluorescence results (***Figure 7***).

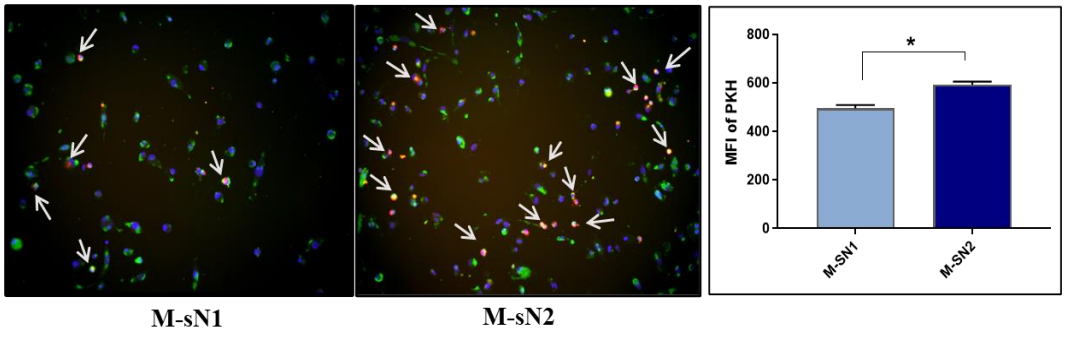


Figure 7. Macrophages exposed to N2 neutrophil secretome engulf apoptotic cardiomyocytes. *Fluorescence microscopy showing the uptake of apoptotic cardiomyocytes (labeled with PKH-red) by human macrophages previously exposed to N1/N2 neutrophil secretome. Macrophages were co-incubated with apoptotic cells for 2 h, and then stained for MerTK receptors (green). Nuclei are labeled with DAPI (blue). White arrows indicate colocalization of apoptotic bodies with the macrophage MerTK receptor, highlighting efferocytosis of apoptotic cardiomyocytes. The quantification graph shows the mean fluorescence intensity of PKH dye, indicating the efficiency of engulfment of apoptotic cardiomyocytes (n = 3, *p < 0.05) (Mihaila et al., 2021).*

CHAPTER 3

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF THERAPY WITH FACTORS RELEASED BY N2 NEUTROPHILS IN A MOUSE MODEL OF MYOCARDIAL INFARCTION

This study aimed to investigate the therapeutic potential of the N2 neutrophil secretome in a mouse model of myocardial infarction, and the main objectives of this study were: (i) to evaluate the therapeutic effect of the N2 neutrophil secretome on systemic inflammation and tissue remodeling post-myocardial infarction in mice, (ii) to compare the impact of the N1 and N2 secretome on the gene expression of inflammatory and pro-fibrotic markers, as well as on collagen deposition in the infarcted area, and (iii) to determine the changes in plasma levels of inflammatory proteins to characterize the systemic inflammatory profile post-treatment. Thus, murine neutrophils were isolated, polarized, and used to obtain the secretome, according to the protocol described in the previous study. Male C57BL/6J mice underwent a surgical procedure to induce myocardial infarction (***Figure 8***) and were subsequently administered concentrated N1/N2 neutrophil secretome.

Figure 8. Main steps in obtaining the murine model of myocardial infarction: *(**1**) Mice were given analgesic and anesthetic (ketamine 80 mg/kg, xylazine 10 mg/kg). (**2**) A 0.5 cm incision was made in the neck, and muscles and fascia were removed. (**3**) The cannula was carefully inserted, connecting to the ventilator for artificial ventilation. (**4**) A 1 cm incision was made in the chest and thoracotomy allowed exposure of the heart. (**5**) The LAD artery was permanently ligated using a 7-0 silk thread to induce myocardial infarction. (**6**) The thoracic cavity was closed, (**7**) and the mice were placed on a heated pad for recovery.*

To confirm the induction of myocardial infarction, 24 hours post-surgery we assessed neutrophil infiltration by immunofluorescence (***Figure 9***) and the expression level of pro-inflammatory markers in the affected region of the left ventricle, using qPCR.

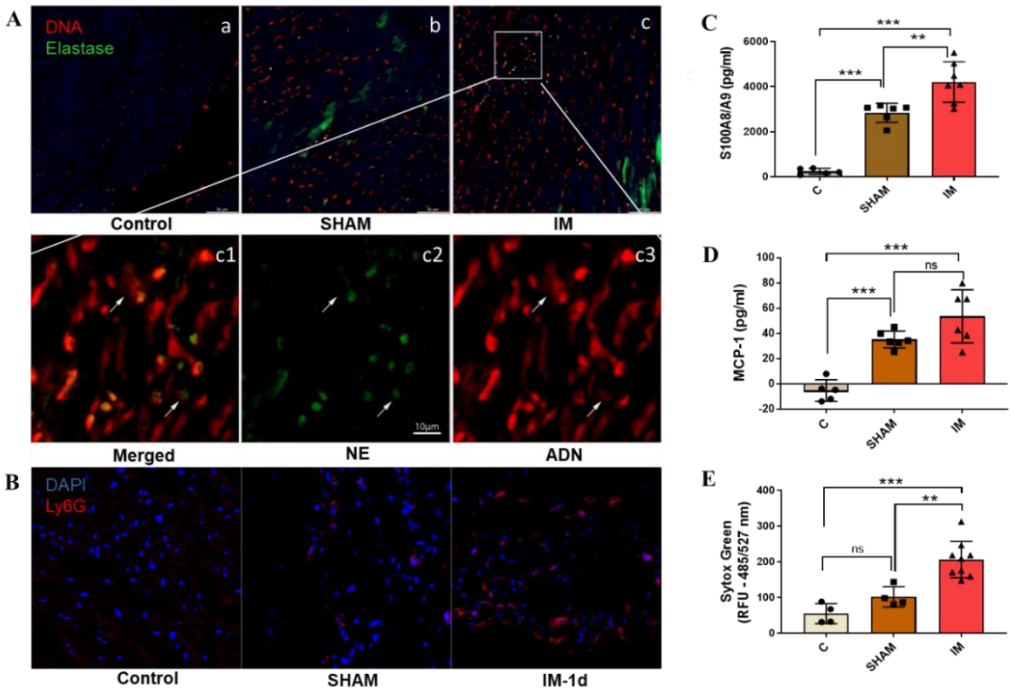


Figure 9. Local and systemic markers of neutrophil activation in acute MI. (A) *Representative images of neutrophil elastase (green) in cardiac tissue from control (a), SHAM (b), or (c) MI mice. DNA is stained in red. The scale bar is 50 µm for images a, b, and c and 10 µm for images c1-c3. Images c1-c3 show a magnified area from image c where infiltrating neutrophils and NETs are visible. (**B**) Immunofluorescence of the neutrophil marker Ly6G (red) in cardiac tissue from control, SHAM, or MI mice. Nuclei are stained with DAPI (blue). (**C, D**) S100A8/A9 and MCP-1 protein levels in plasma from control, SHAM, or MI mice as assessed by ELISA. (**E**) Presence of DNA in plasma of control, SHAM, or IM mice after fluorescent staining with Sytox Green. n=4-6, **p<0.01, ***p<0.001. Data are represented as mean ± SD (manuscript submitted for publication; Ciortan, Mihaila et al., 2025).*

To investigate the role of soluble factors released by N1/N2 neutrophils in the process of tissue repair after myocardial infarction, secretome was injected into the ischemic area immediately after coronary artery ligation. At 7 days post-infarction, hearts and blood samples of mice were harvested and analyzed to evaluate the impact of this treatment. The expression of some pro-inflammatory (Il-6, IL-1β, and MCP-1) and pro-fibrotic (CCN2, CCN5, and αSMA) markers was slightly decreased in mice treated with N1/N2 secretome compared to untreated mice.

Administration of the secretome from polarized neutrophils influenced the post-infarction reparative phase by reducing the number of myofibroblasts and leukocyte infiltration, evidenced by the decrease in αSMA and MPO in the fibrotic area of infarct lesions, according to immunofluorescence analyses (***Figure 10***).

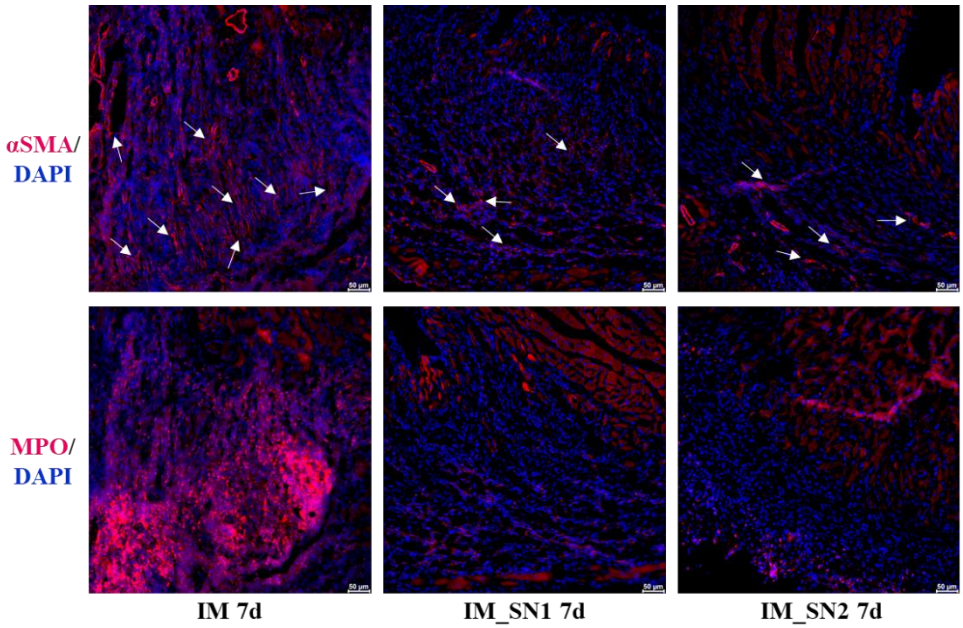


Figure 10. *Immunofluorescent analysis of markers associated with fibrosis and neutrophil infiltration in cardiac tissue of IM, IM_SN1, and IM_SN2 mice, 7 days after ischemia. αSMA (myofibroblast marker) and MPO (neutrophil-specific marker) are labeled in red, cell nuclei are labeled with DAPI (blue) (manuscript submitted for publication; Ciortan, Mihaila et al., 2025).*

In addition, histological analysis of Picrosirius Red stained sections revealed a reduction in collagen deposition in IM mice injected with N2 secretome compared to mice injected with N1 secretome or untreated mice (***Figure 11***).

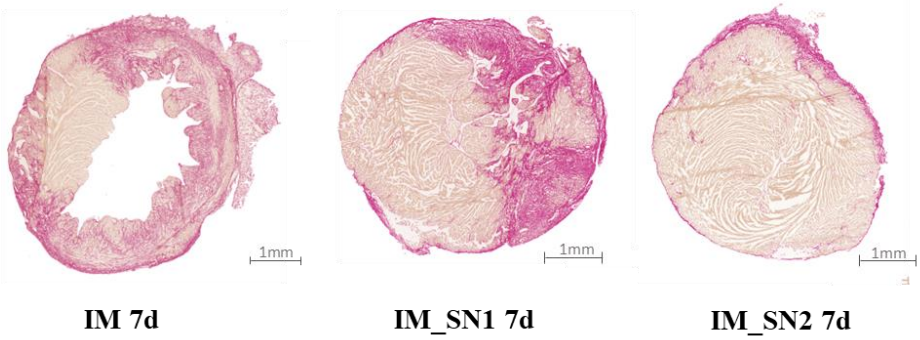


Figure 11. *Picrosirius Red staining of cardiac tissue sections, harvested from MI mice or SN1/SN2-treated MI mice, 7 days after ischemia. Red areas indicate the presence of collagen. Scale bar=1 mm (manuscript submitted for publication; Ciortan, Mihaila et al., 2025).*

CONCLUSIONS AND ORIGINAL CONTRIBUTIONS

The results obtained in the three studies support the idea that neutrophils are heterogeneous immune cells, with distinct transcriptional and functional profiles, reflecting varied roles in the context of inflammation and tissue repair. As shown in **the first study** of this doctoral thesis, N1 neutrophils have a pro-inflammatory profile, characterized by increased production of inflammatory cytokines and chemokines, high levels of ROS, NO, intense enzymatic activity, and increased migratory capacity, while N2 neutrophils have a gene and functional profile associated with the resolution of inflammation. They produce anti-inflammatory cytokines and chemokines, produce low levels of ROS, and NO, and have diminished enzymatic activity and reduced chemotaxis. Blocking S100A9 diminished the inflammatory character of the N1 subpopulation, suggesting a potential therapeutic route.

The results of **the second study** showed that N2 neutrophils can modulate the phenotype of macrophages towards a pro-reparative one through the soluble factors secreted by them. In this study, it was demonstrated that the N2 secretome induces the expression of receptors involved in the efferocytosis process (MerTK, CD36, CXCR1, integrin αv/β5), as well as bridging molecules (MFG-E8, Gas6, protein S) in macrophages, favoring the efficient elimination of apoptotic cells and thus promoting tissue healing.

The third study confirms these beneficial effects of N2 secretome in a murine model of myocardial infarction. According to the data obtained, local administration of N2 secretome led to a reduction in leukocyte infiltration (evidenced by a decrease in the neutrophil marker MPO), a reduction in the number of myofibroblasts (evidenced by a decrease in the specific marker α-SMA), but also by a decrease in collagen deposition, suggesting an attenuation of the fibrotic process. These effects support the reparative role of N2 neutrophils and their therapeutic potential in limiting the excessive remodeling of cardiac tissue.

The studies presented in this thesis have several important **limitations** that should be acknowledged. One major limitation is that the experimental systems used in the first and second studies are simplified and may not fully replicate the complexity of the infarcted area *in vivo*. Additionally, while the studies focus on the N1 and N2 neutrophil subtypes, it's important to note that various neutrophil subtypes may play different roles during different phases of inflammation and post-infarction remodeling, as demonstrated by Vafadarnejad and colleagues (Vafadarnejad et al., 2020). Therefore, a more thorough investigation of these neutrophil subtypes is warranted. Another significant limitation identified in the last study is the small number of animals used in each experimental group. While the results suggest a

potential immunomodulatory role for the neutrophil-derived secretome in post-infarction inflammation, these findings need to be confirmed with a larger sample size. Furthermore, an in-depth analysis targeting various experimental time points is necessary to evaluate the dynamics of the inflammatory response and the effect of the administered secretome on long-term cardiac remodeling.

The findings presented in this doctoral thesis were achieved with the support of the INNATE-MI research project (PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0172) and PN-III-P2.1-PED-2019-4906. These results reflect the collaborative efforts of the research team in the Inflammation Laboratory at the Institute of Biology and Pathology "Nicolae Simionescu".

References

1. Ciortan, L., Gan, A.M., Cecoltan, S., Serbanescu, M., Mihaila, A.C., Macarie, R.D., Tucureanu, M., Naie, M.L., Preda, M.B., Bila, G., Bilyy, R., and Butoi, E., 2025. Factors released by polarized neutrophils modulate fibroblast's inflammatory phenotype in vitro and limit the conversion of fibroblast to myofibroblasts post-myocardial infarction. Manuscript submitted for publication at *Cell Communication and Signaling*.
2. Denny, M.F., Yalavarthi, S., Zhao, W., Thacker, S.G., Anderson, M., Sandy, A.R., McCune, W.J. and Kaplan, M.J., 2010. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *The journal of immunology*, *184*(6), pp.3284-3297.
3. Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S. and Albelda, S.M., 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-β:"N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell*, *16*(3), pp.183-194.
4. Hong, C.W., 2017. Current understanding in neutrophil differentiation and heterogeneity. *Immune network*, *17*(5), p.298.
5. Kloc, M., Ghobrial, R.M., Wosik, J., Lewicka, A., Lewicki, S. and Kubiak, J.Z., 2019. Macrophage functions in wound healing. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *13*(1), pp.99-109.
6. Kraus, R.F. and Gruber, M.A., 2021. Neutrophils—from bone marrow to first-line defense of the innate immune system. *Frontiers in immunology*, *12*, p.767175.
7. Kumar, S. and Dikshit, M., 2019. Metabolic insight of neutrophils in health and disease. *Frontiers in immunology*, *10*, p.2099.
8. Ma, Y., Yabluchanskiy, A., Iyer, R.P., Cannon, P.L., Flynn, E.R., Jung, M., Henry, J., Cates, C.A., Deleon-Pennell, K.Y. and Lindsey, M.L., 2016. Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction. *Cardiovascular research*, *110*(1), pp.51-61.
9. Mihaila, A.C., Ciortan, L., Macarie, R.D., Vadana, M., Cecoltan, S., Preda, M.B., Hudita, A., Gan, A.M., Jakobsson, G., Tucureanu, M.M. and Barbu, E., 2021. Transcriptional profiling and functional analysis of N1/N2 neutrophils reveal an immunomodulatory effect of S100A9-blockade on the pro-inflammatory N1 subpopulation. *Frontiers in immunology*, *12*, p.708770.

10. Mihaila, A.C., Ciortan, L., Tucureanu, M.M., Simionescu, M. and Butoi, E., 2024. Anti-inflammatory neutrophils reprogram macrophages toward a pro-healing phenotype with increased efferocytosis capacity. *Cells*, *13*(3), p.208.
11. Nahrendorf, M., Pittet, M.J. and Swirski, F.K., 2010. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*, *121*(22), pp.2437-2445.
12. Ojha, N. and Dhamoon, A.S., 2023. Myocardial infarction. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
13. Prabhu, S.D. and Frangogiannis, N.G., 2016. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis. *Circulation research*, *119*(1), pp.91-112.
14. Schloss, M.J., Horckmans, M., Nitz, K., Duchene, J., Drechsler, M., Bidzhekov, K., Scheiermann, C., Weber, C., Soehnlein, O. and Steffens, S., 2016. The time-of-day of myocardial infarction onset affects healing through oscillations in cardiac neutrophil recruitment. *EMBO molecular medicine*, *8*(8), pp.937-948.
15. Shrivastava, R. and Shukla, N., 2019. Attributes of alternatively activated (M2) macrophages. *Life sciences*, *224*, pp.222-231.
16. Silvestre-Roig, C., Fridlender, Z.G., Glogauer, M. and Scapini, P., 2019. Neutrophil diversity in health and disease. *Trends in immunology*, *40*(7), pp.565-583.
17. Sun, B., Wang, L., Guo, W., Chen, S., Ma, Y. and Wang, D., 2023. New treatment methods for myocardial infarction. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *10*, p.1251669.

ACADEMIA ROMÂNĂ
Şcoala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Heterogenitatea, funcționalitatea și potențialul terapeutic al neutrofilelor în infarctul miocardic

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
Acad. Maya Simionescu

DOCTORAND:
Cristina-Andreea Mihăilă

București
2025

CUPRINS

Lista cu abrevieri și simboluri.....9

Introducere.....13

PARTEA I
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. BIOLOGIA ȘI FUNCȚIILE NEUTROFILELOR.....19

1.1. Originea și formarea neutrofilelor.....21

1.2. Rolul neutrofilelor în răspunsul inflamator.....24

1.2.1. Recrutarea neutrofilelor în zona inflamată.....24

1.2.2. Funcțiile neutrofilelor la locul inflamației.....31

1.2.2.1. Degranularea și producerea de citokine.....31

1.2.2.2. Fagocitoza.....33

1.2.2.3. Generarea de specii reactive de oxigen (ROS).....35

1.2.2.4. Formarea de capcane extracelulare (NET).....36

1.3. Implicarea neutrofilelor în ateroscleroză.....39

2. PATOFIZIOLOGIA INFARCTULUI DE MIOCARD.....42

2.1. Etiologia și epidemiologia infarctului de miocard.....42

2.2. Fazele reparării cardiace post infarct miocardic.....43

2.2.1. Faza inflamatorie.....45

2.2.2. Faza proliferativă.....53

2.2.3. Faza de maturare.....57

3. IMPLICAREA NEUTROFILELOR ÎN INFARCTUL MIOCARDIC.....59

3.1. Efectele neutrofilelor asupra țesutului miocardic.....59

3.1.1. Rolul neutrofilelor în faza inflamatorie.....59

3.1.2. Rolul neutrofilelor în faza reparatorie.....60

3.2. Heterogenitatea și plasticitatea neutrofilelor.....61

3.3. Interacțiunea neutrofilelor cu macrofagele.....64

3.4. Strategii terapeutice bazate pe neutrofile.....65

3.4.1. Țintirea directă a neutrofilelor (Ly6G, CXCR2, GSDMN).....66

3.4.2. Țintirea factorilor eliberați de neutrofile (ROS, S100A9, MPO, NET).....68

PARTEA II

CONTRIBUȚII ORIGINALE

1. IDENTIFICAREA DE NOI MARKERI SPECIFICI, MECANISME DE SEMNALIZARE ȘI CARACTERISTICI FUNCȚIONALE ALE NEUTROFILELOR POLARIZATE N1 ȘI N2; EFECTUL IMUNOMODULATOR AL BLOCĂRII S100A9 ASUPRA NEUTROFILELOR N1.....73

1.1. Introducere și obiective.....73

1.2. Materiale și metode.....75

1.2.1. Model animal.....75

1.2.2. Izolarea și polarizarea neutrofilelor.....75

1.2.3. Secvențierea ARNm în neutrofilele polarizate.....77

1.2.4. Analiza expresiei diferențiale.....79

1.2.5. Analiza expresiei genelor reglate diferențial (DEG).....79

1.2.6. Analiza cantitativă a expresiei genice prin metoda *Real-time PCR* 80

1.2.7. Analiza citokinelor și chemokinelor din secretomul neutrofilelor prin *Proteome Profiler Array*.....81

1.2.8. Evaluarea expresiei proteice din secretomul neutrofilelor prin ELISA.....82

1.2.9. Măsurarea speciilor reactive de oxigen.....82

1.2.10. Analiza profilului energetic al neutrofilelor N1 și N2.....82

1.2.11. Analiza capacității chemotactice a neutrofilelor polarizate.....83

1.2.12. Evaluarea activității gelatinolitice a MMP-9 prin zimografie.....83

1.2.13. Analiza expresiei proteice prin Western Blotting.....84

1.2.14. Detecția mieloperoxidazei (MPO) și a oxidului nitric (NO).....84

1.2.15. Analiza statistică.....85

1.3. Rezultate.....85

1.3.1. Neutrofilele N1 și N2 prezintă un profil transcripțional distinct.....85

1.3.2. Validarea prezenței neutrofilelor N1 în modele *in vivo* de inflamație acută 90

1.3.3. Blocarea lui S100A9 scade expresia genică a moleculelor chemotactice mieloide CCL2, CCL3 și CCL5 în neutrofilele N1.....93

1.3.4. Cuantificarea mediatorilor moleculari solubili ai răspunsului imun eliberați de neutrofilele N1 și N2.....94

1.3.5. Evaluarea funcțională a subtipurilor de neutrofile N1 și N2.....95

1.3.5.1. Producerea de ROS și NO.....95

1.3.5.2. Profilul energetic ale neutrofilelor N1 și N2.....96

1.3.5.3. Activitatea MPO și MMP-9 în neutrofilele polarizate N1 și N2 97

1.3.5.4. Transmigrarea neutrofilelor polarizate.....98

1.3.6. Mecanisme de semnalizare activate în neutrofilele polarizate.....99

1.3.6.1. Subunitățile NADPH oxidazei reglează producerea de ROS în neutrofilele pro-inflamatorii (N1).....99

1.3.6.2. Protein kinazele și factorii de transcripție activați în neutrofilele polarizate N1/N2.....100

1.4. Discuții.....102

1.5. Concluzii parțiale.....106

1.6. Limitările studiului.....107

2. INVESTIGAREA CAPACITĂȚII NEUTROFILELOR N2 DE A INDUCE POLARIZAREA MACROFAGELOR ÎNTR-UN FENOTIP REPARATOR (MERTK+).....108

2.1. Introducere și obiective.....108

2.2. Materiale și metode.....110

2.2.1. Izolarea și polarizarea neutrofilelor.....110

2.2.3. Model experimental.....111

2.2.4. Analiza expresiei genice prin Real-time PCR.....111

2.2.5. Analiza expresiei proteice din supernatantul neutrofilelor N1/N2 și al macrofagelor prin tehnica ELISA.....113

2.2.6. Determinarea expresiei proteice în lizatul celular prin Western Blot.....113

2.2.7. Obținerea cardiomiocitelor apoptotice și evaluarea apoptozei prin citometrie în flux.....114

2.2.8. Analiza prin imunofluorescență a moleculei MerTK cu rol important în eferocitoză.....114

2.2.9. Determinarea capacității eferocitice a macrofagelor prin imunofluorescență.....115

2.2.10. Analiza statistică.....115

2.3. Rezultate.....115

2.3.1. Factorii eliberați de neutrofilele N1/N2 modulează diferit expresia markerilor inflamatori/antiinflamatori în macrofage.....115

2.3.2. Macrofagele expuse la factorii eliberați de neutrofilele N2 induc creșterea expresiei receptorilor implicați în recunoașterea celulelor apoptotice.....119

2.3.3. Moleculele de legătură MFG-E8 și Gas6 sunt exprimate de macrofagele expuse la secretomul neutrofilelor N2.....121

2.3.4. Calea de semnalizare declanșată de factorii eliberați de neutrofilele N1/N2 în macrofage.....123

2.3.5. Capacitatea de eferocitoză a macrofagelor este crescută de factorii eliberați de neutrofilele N2.....125

2.4. Discuții.....127

2.5. Concluzii parțiale.....131

2.6. Limitările studiului.....131

3. INVESTIGAREA EFECTULUI TERAPIEI CU FACTORI ELIBERAȚI DE NEUTROFILELE N2 ÎNTR-UN MODEL DE ȘOARECE CU INFARCT MIOCARDIC.....133

3.1. Introducere și obiective.....133

3.2. Materiale și metode.....135

3.2.1. Obținerea secretomului de neutrofile N1 și N2.....135

3.2.2. Procedura chirurgicală de inducere a infarctului miocardic și injectarea secretomului concentrat de la neutrofilele N1/N2.....136

3.2.3. Evaluarea expresiei genice a markerilor inflamatori și pro-fibrotici prin Real-time PCR.....138

3.2.4. Analiza histologică și imunohistochimică a inimilor de șoarece cu infarct miocardic.....139

3.2.5. Determinarea proteinelor IL-6, MCP-1, S100A8/A9 și TGF-β în plasma șoarecilor prin ELISA.....140

3.2.6. Cuantificarea ADN-ului extracelular circulant.....140

3.2.7. Analiza statistică.....140

3.3. Rezultate.....141

3.3.1. Infiltrarea miocardului de către neutrofile în prima zi post-infarct miocardic se corelează cu niveluri crescute de ADN extracelular circulant și molecule inflamatorii.....141

3.3.2. Efectul injectării secretomului de N1/N2 în procesul de reparare a țesutului post-infarct miocardic.....143

3.4. Discuții.....148

3.5. Concluzii parțiale.....149

3.6. Limitările studiului.....150

CONCLUZII GENERALE.....151

BIBLIOGRAFIE.....155

Cuvinte cheie: infarct miocardic, neutrofile N1/N2, S100A9, macrofage, secretomul neutrofilelor, eferocitoză

Număr total de pagini: 174

Număr de figuri în "Stadiul actual al cunoșterii": 11

Număr de figuri în "Contribuţii originale": 40

Număr de tabele în "Contribuţii originale": 5

Referințe bibliografice: 189

Lucrări publicate în reviste indexate ISI: 10

- autor principal: 3
- co-autor: 7

Lucrări prezentate la manifestări științifice: 1

Postere prezentate la manifestări științifice: 7

- naționale: 4
- internaționale: 3

Brevete: 1

Bursă de doctorat finanțată de Academia Română (SCOSAAR): 2020-2023

Proiecte de cercetare – în calitate de membru în echipa de cercetare: 5

INTRODUCERE ȘI OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI

În ultimele decenii, infarctul miocardic (IM), denumit colocvial „atac de cord”, a atras un interes crescut în domeniul cercetării cardiovasculare, ca urmare a ratei ridicate de morbiditate, mortalitate și a opțiunilor terapeutice încă limitate. Această afecțiune severă este cauzată de întreruperea bruscă a fluxului sanguin către o regiune a mușchiului cardiac, cel mai frecvent din cauza unui cheag de sânge, ceea ce determină blocarea unei artere coronare și implicit scăderea aportului de oxigen către miocard. Privarea prelungită de oxigen poate duce la moartea cardiomiocitelor și necroza țesutului cardiac, evenimente care declanșează un răspuns inflamator acut, esențial pentru eliminarea celulelor moarte și inițierea procesului de reparare tisulară (Ojha și Dhamoon, 2023). Deși progresele din ultimii ani în terapiile farmacologice și intervențiile minim invazive au contribuit semnificativ la îmbunătățirea prognosticului pacienților cu infarct miocardic, incidența insuficienței cardiace rămâne în continuă creștere (Sun și colab., 2023).

Sistemul imunitar are un rol esențial în evoluția post-infarct, iar neutrofilele – celule heterogene ce constituie prima linie de apărare a organismului (Kraus și Gruber, 2021) – participă activ atât la amplificarea răspunsului inflamator (neutrofile N1), cât și la inițierea proceselor de reparare tisulară post-infarct miocardic (neutrofile N2) (Ma și colab., 2016). Descoperirea recentă a heterogenității neutrofilelor, în special a celor două subpopulații principale — N1 și N2 — a subliniat necesitatea unor cercetări suplimentare pentru caracterizarea mai precisă a profilului lor transcripțional și funcțional.

În acest context, teza de față a avut ca scop principal să caracterizeze atât transcripțional, cât și funcțional, subpopulațiile de neutrofile implicate în faza inflamatorie post-IM, precum și să evalueze, *in vitro* și *in vivo*, potențialul terapeutic al neutrofilelor N2 cu rol antiinflamator. Identificarea subpopulațiilor de neutrofile relevante din punct de vedere clinic ar putea contribui la îmbunătățirea diagnostigului unor afecțiuni specifice și/sau va ajuta la dezvoltarea unor strategii terapeutice inovatoare.

Principalele obiective științifice ale tezei de doctorat au fost: i) Identificarea de noi markeri specifici, mecanisme de semnalizare și caracteristici funcționale ale neutrofilelor polarizate N1 și N2; efectul imunomodulator al blocării S100A9 asupra neutrofilelor N1; ii) Investigarea capacității neutrofilelor N2 de a induce polarizarea macrofagelor către un

fenotip reparator (MerTK+); iii) Investigarea efectului terapiei cu factori eliberați de neutrofilele N2 într-un model de șoarece cu infarct miocardic.

Teza de doctorat este structurată în două parți principale. **Prima partea** a tezei, intitulată *"Stadiul actual al cunoașterii"*, oferă o analiză a literaturii de specialitate necesară pentru a pune în context tema de cercetare abordată. Aceasta este structurată în trei capitole și abordează aspecte fundamentale privind biologia și funcțiile neutrofilelor, patofiziologia infarctului miocardic, precum și rolul neutrofilelor în acest context patologic. Cea de-**a doua parte a lucrării**, numită *"Contribuții originale"*, prezintă activitatea experimentală desfășurată și rezultatele obținute în cadrul acestei cercetări. Această parte este structurată în trei studii distincte.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Neutrofilele, cunoscute și sub numele de leucocite polimorfonucleare, reprezintă prima linie de apărare a organismului, având un rol esențial în promovarea răspunsului imun înnăscut (Kraus și Gruber, 2021). Acestea se formează în măduva osoasă și sunt eliberate în circulație după maturizare, fiind stimulate de agenți patogeni și semnale inflamatorii care determină migrarea lor către locurile de infecție sau leziuni tisulare. La locul infecției, neutrofilele își exercită funcțiile de apărare printr-o serie de mecanisme coordonate, care includ producerea de specii reactive de oxigen (ROS) prin activarea NADPH oxidazei, eliberarea de componente citotoxice din granule și formarea de capcane extracelulare (NET) (Kumar și Dikshit, 2019).

Deși mult timp au fost considerate o populație omogenă cu fenotip și funcție conservate, dovezi recente sugerează existența unei heterogenități a neutrofilelor, cu fenotipuri funcționale distincte, atât la indivizi sănătoși, cât și în condiții patologice, inclusiv cancer, infecții și boli autoimune sau inflamatorii (Hong, 2017; Silvestre-Roig și colab., 2019). Această diversitate a populațiilor de neutrofile se caracterizează prin diferențe în durata de viață, eliberarea de citokine, expresia proteinelor de suprafață, răspunsurile antibacteriene, precum și prin funcții proinflamatorii, pro-angiogenice sau imunosupresoare (Hong, 2017; Silvestre-Roig și colab., 2019; Fridlender și colab., 2009; Denny și colab., 2010).

Într-un model murin de infarct miocardic, au fost descrise două subpopulații de neutrofile infiltrate în miocard: neutrofile proinflamatorii (N1) și antiinflamatorii (N2). Neutrofilele cardiace N1, izolate în prima zi post-IM, în timpul fazei inflamatorii, prezintă niveluri

ridicate ale markerilor proinflamatori (CCL3, IL-1β, IL-12a și TNF-α). În schimb, neutrofilele N2, izolate în zilele 5 și 7, în faza de reparare, exprimă markeri antiinflamatori, precum CD206 și IL-10. Polarizarea *in vitro* a neutrofilelor cu lipopolizaharidă (LPS) și interferon-γ (IFN-γ) pentru N1 sau interleukina-4 (IL-4) pentru N2, a dus la exprimarea unor markeri specifici pentru N1/N2, similari celor identificați *in vivo* (Ma și colab., 2016). Descoperirea rolului diferitelor subtipuri de neutrofile în promovarea sau rezolvarea inflamației ar putea avea o relevanță terapeutică semnificativă, permițând direcționarea selectivă către o anumită subpopulație pentru a modula evoluția bolii.

Post-IM, neutrofilele ajunse în zona infarctată facilitează infiltrarea monocitelor din sânge, care se diferențiază în macrofage și contribuie la îndepărtarea resturilor de țesut cardiac și a celulelor apoptotice, ducând, la rândul lor, la activarea căilor reparatorii necesare remodelării cardiace (Prabhu și Frangogiannis, 2016). În timp ce celulele imune înnăscute joacă un rol crucial în vindecarea cardiacă, un răspuns imun dezechilibrat sau exagerat după IM, precum și o plasticitate defectuoasă a acestor celule, pot exacerba deteriorarea țesuturilor și, ulterior, pot declanșa o remodelare maladaptativă (Nahrendorf și colab., 2010; Schloss și colab., 2016).

În miocardul ischemic, macrofagele demonstrează un grad remarcabil de plasticitate și sunt implicate în mod complex atât în procesele inflamatorii, cât și în cele reparatorii (Nahrendorf, 2018). Macrofagele sunt clasificate în mod obișnuit în două grupuri distincte, activate în mod clasic – macrofage M1 (inflamatorii) și activate alternativ – macrofage M2 (antiinflamatorii), deși profilul fenotipic al macrofagelor cardiace este mult mai divers. În timp ce macrofagele M1 sunt implicate în principal în fagocitoză și exacerbarea inflamației (Shapouri-Moghaddam și colab., 2018), macrofagele M2 stimulează repararea și regenerarea țesuturilor și au proprietăți eferocitice, pro-fibrotice și pro-angiogene (Shrivastava și Shukla, 2019). Prin urmare, direcția de polarizare a macrofagelor post-IM joacă un rol crucial în rezolvarea inflamației, regenerarea țesuturilor și procesul de vindecare a rănilor (Kloc și colab., 2019).

Având în vedere importanța crucială a macrofagelor pro-vindecare M2 în procesul de vindecare cardiacă în faza reparatorie, direcționarea neutrofilelor către subtipul N2 ar putea reprezenta o strategie terapeutică promițătoare post-infarct miocardic (Mihaila și colab., 2024).

CONTRIBUȚII ORIGINALE

Obiectivele științifice ale tezei:

Obiectivul 1: Identificarea de noi markeri specifici, mecanisme de semnalizare și caracteristici funcționale ale neutrofilelor polarizate N1 și N2; efectul imunomodulator al blocării S100A9 asupra neutrofilelor N1;

Obiectivul 2: Investigarea capacității neutrofilelor N2 de a induce polarizarea macrofagelor către un fenotip reparator (MerTK+);

Obiectivul 3: Investigarea efectului terapiei cu factori eliberati de neutrofilele N2 într-un model de șoarece cu infarct miocardic.

Metodologia de cercetare:

În cele trei studii realizate au fost aplicate atât **tehnici *in vitro*,** cât și ***in vivo*.** *În vitro*, s-au utilizat metode de izolare și polarizare a neutrofilelor murine și umane, co-culturi cu macrofage, precum și teste funcționale precum eferocitoză, citometrie în flux, ELISA, qRT-PCR, Western blot, histologie, imunohistochimie, analize metabolice (Seahorse), analize de transmigrare celulară (xCELLigence) și analize transcriptomice (secvențiere de ARNm). *In vivo*, a fost implementat un model murin de infarct miocardic obținut prin ligarea arterei coronariane descendente anterioară stângă căruia i s-a administrat în zona infarctizată secretom provenit de la neutrofile murine polarizate către fenotipurile N1 și N2.

CAPITOLUL 1

IDENTIFICAREA DE NOI MARKERI SPECIFICI, MECANISME DE SEMNALIZARE ȘI CARACTERISTICI FUNCȚIONALE ALE NEUTROFILELOR POLARIZATE N1 ȘI N2; EFECTUL IMUNOMODULATOR AL BLOCĂRII S100A9 ASUPRA NEUTROFILELOR N1

Primul studiul prezentat în secțiunea *Contribuții originale* a vizat identificarea unor markeri specifici, mecanisme de semnalizare și caracteristici funcționale ale neutrofilelor polarizate de tip N1 și N2. Acest studiu a avut două obiective principale: (i) efectuarea unei analize comparative a genotipului, fenotipului și funcției neutrofilelor N1 și N2 și (ii) investigarea impactului blocării moleculei S100A9 cu ABR-238901 asupra funcțiilor celor două subpopulații de neutrofile.

În acest scop, neutrofile murine au fost izolate din măduva oasoasă a tibiei și femurului, apoi au fost polarizate către N1 utilizând LPS și IFN-γ și către fenotipul N2 folosind IL-4, întrucât aceste condiții de polarizare reflectă fenotipurile neutrofilelor N1/N2 identificate *in vivo* în inimile infarctate (Ma și colab., 2016). Neutrofilele nestimulate au fost utilizate ca grup control. Rezultatele analizei de secvențiere a ARNm au evidențiat profiluri transcripționale și funcționale distincte pentru populațiile de neutrofile N1 și N2. În cazul neutrofilelor N1, au fost identificate 966 de gene exprimate diferit comparativ cu grupul control, dintre care 771 au prezentat un nivel de expresie crescută, iar 195 au avut un nivel de expresie redusă. În neutrofilele N2, au fost detectate 532 de gene exprimate diferit , dintre care 408 au fost suprareglate, iar 124 subreglate (***Figura 1***).

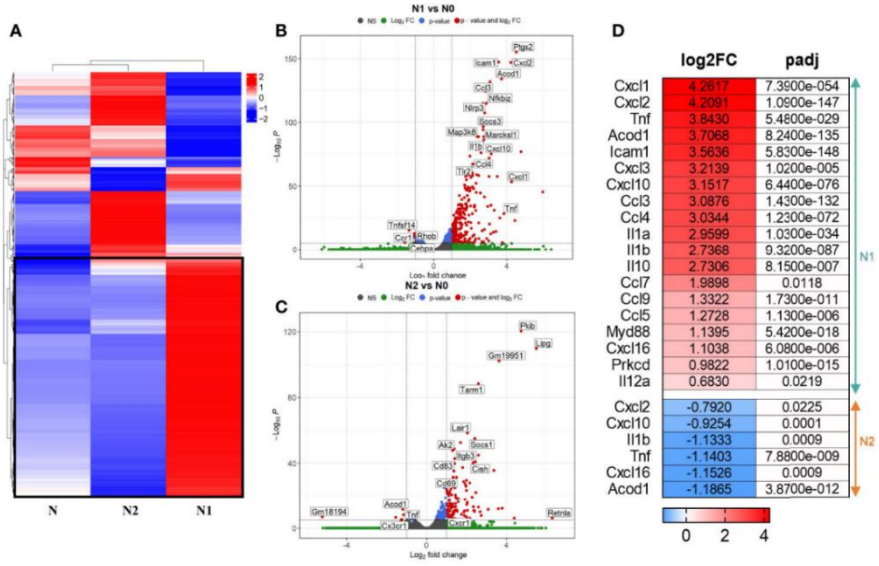
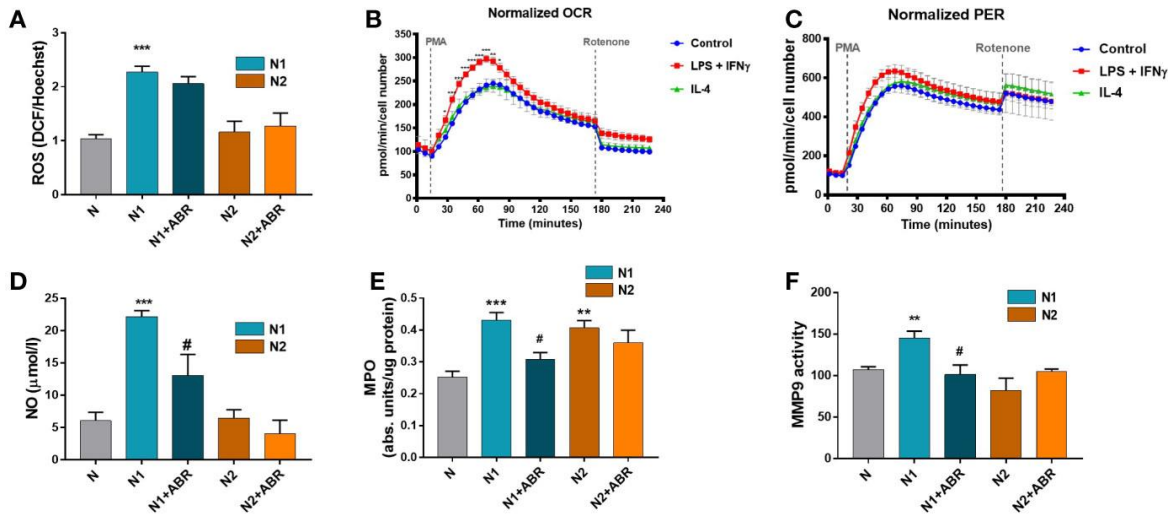


Figura 1. Profilul expresiei genice a diferitelor subseturi de neutrofile. *(**A**) Analiza Heatmap de clusterizare ierarhică a neutrofilelor N, N1 și N2. Analiza de clusterizare ierarhică a fost realizată pe log2 (FPKM+1) al genelor exprimate diferențial în cadrul tuturor grupurilor de comparație. Codarea culorilor indică diferite niveluri de expresie: roșu indică gene cu expresie*

*ridicată, iar albastru cu expresie scăzute. Un cluster major de DEG suprareglate în N1 este evidențiat într-un pătrat negru. (**B, C**) Graficul de tip Volcano plot al expresiei diferențiale a genelor între neutrofilele N1/N2 și N. Punctele roșii reprezintă gene suprareglate semnificativ și subreglate cu – adjP < 0,05 și Log2FC > 1: 771 gene au fost suprareglate și 195 gene au fost subreglate în neutrofilele N1 vs N, iar 532 de gene au fost suprareglate și 124 de gene au fost subreglate în celulele N2 vs N. (**D**) Heatmap care arată modificarea log2 Fold și valoarea p ajustată pentru citokine și chemokine inflamatorii selectate, exprimate diferențial fie în neutrofile N1 (panoul superior), fie în neutrofile N2 (panoul inferior). Culoarea roșie indică genele suprareglate, iar cea albastră genele subreglate. (**E**) Graficul Manhattan care ilustrează rezultatele analizei de îmbogățire a clusterului de gene puternic suprareglate în N1 comparativ cu neutrofilele N și N2. Termenii funcționali sunt grupați și codificați pe culori după sursele de date, adică funcția moleculară (MF) în roșu, procesele biologice (BP) în portocaliu, componentele celulare (CC) în verde, KEGG în roz și TRANSFAC în albastru închis. Termenii numerotați sunt detaliați sub grafic cu valorile lor adjP respective (Mihaila și colab., 2021).*

Pentru a identifica mecanismele moleculare responsabile de activarea către un fenotip proinflamator al neutrofilelor au fost efectuate experimente care au vizat blocarea S100A9, o alarmină abundent exprimată de neutrofile și care semnalizează prin legarea la receptorii TLR4 și RAGE. Astfel, neutrofilele N1 și N2 au fost polarizate în prezența ABR-238901, un inhibitor specific al moleculei S100A9. Rezultatele au arătat că neutrofilele N1 prezintă un fenotip proinflamator, caracterizat prin eliberarea crescută de citokine și chemokine inflamatorii, generarea unor niveluri ridicate de ROS și NO, o explozie oxidativă crescută, o activitate crescută a enzimelor MPO și MMP-9, precum și o chemotaxie accentuată (***Figura 2).***



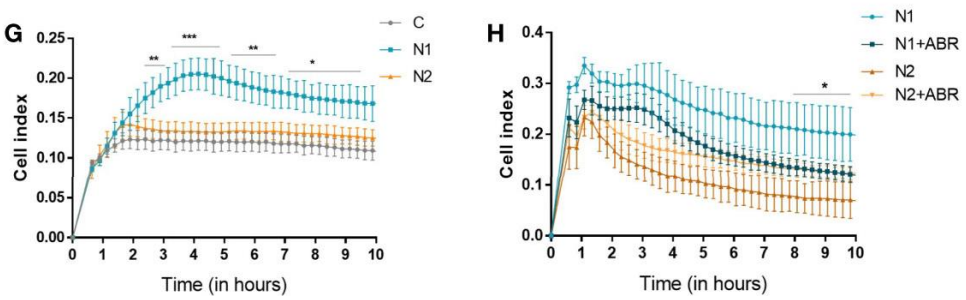


Figura 2. Analiza funcțională a populațiilor de neutrofile. *Celulele au fost tratate timp de 18 ore cu LPS + IFNγ (N1) sau IL-4 (N2) în prezența sau absența ABR-238901 (ABR).* ***(A)*** *Cuantificarea ROS intracelulare folosind testul DCFDA.* ***(B, C)*** *Măsurarea exploziei oxidative a neutrofilelor evaluată ca răspuns PMA:* ***(B)*** *rata consumului de oxigen (OCR) și* ***(C)*** *rata de eflux de protoni glicolitici (PER), calculată folosind măsurători ale ratei de acidificare extracelulară (ECAR).* ***(D)*** *Cuantificarea NO eliberat în mediul condiționat al subtipurilor de neutrofile.* ***(E)*** *Evaluarea activității enzimatice MPO în lizatul celular al populațiilor de neutrofile.* ***(F)*** *Cuantificarea activității gelatinazei MMP-9 evaluată prin zimografie SDS-PAGE în mediul condiționat al neutrofilelor.* ***(G, H)*** *Activitatea chemotactică a populațiilor de neutrofile față de IL-8 evaluată folosind CIM-plate 16 și sistemul xCELLigence RTCA DP; fiecare experiment a constat în neutrofile combinate de la cel puțin 5 șoareci. Datele sunt prezentate ca schimbare medie față de control ± SE (n = 4). Semnificația statistică este prezentată ca *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, #p ≤ 0,05 (Mihaila și colab., 2021).*

În schimb, neutrofilele N2 prezintă un fenotip antiinflamator, cu o expresie crescută a markerilor CD206, Ym1 și Arg 1 (***Figura 3***), având niveluri similare de ROS, NO, explozie oxidativă și răspuns chemotactic cu neutrofilele nestimulate (control) (***Figura 2***).

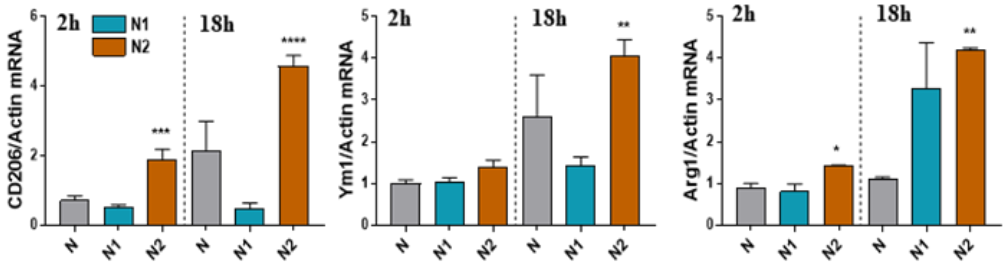


Figura 3. Expresia genică a markerilor antiinflamatori în neutrofile polarizate timp de 2 sau 18 ore cu LPS+IFNγ (N1) sau IL-4 (N2). *qPCR pentru markeri antiinflamatori: IL-10, CD206, Ym1 și Arg1, în N1, N2 și N. n = 5, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 (N1 sau N2 vs. N) (Mihaila și colab., 2021).*

De asemenea, am descoperit că formele fosforilate ale ERK1/2 și p65, molecule de semnalizare care sunt asociate cu fenotipul inflamator, sunt semnificativ crescute în N1, dar nu și în neutrofilele N2, iar blocarea lui S100A8/A9 scade fosforilarea acestor proteine, ceea ce duce la o scădere a producției de chemokine CCL2, CCL3 și CCL5 (***Figura 4***), la diminuarea activității NO, MPO și MMP-9, precum și la o transmigrare mai lentă a neutrofilelor N1 către chemoatractantul IL-8 folosit ***(Figura 2***).

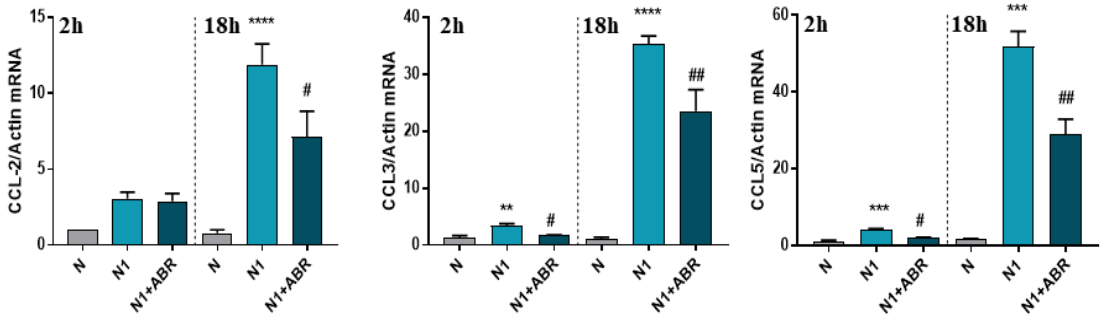


Figura 4. Expresia genică a markerilor inflamatori în neutrofile polarizate timp de 2 sau 18 ore cu LPS+IFNγ (N1) sau IL-4 (N2). *(**A-G**) qPCR pentru markeri inflamatori: CCL5, CCL2, în N1 și N2 în comparație cu neutrofilele control (N). (n = 5, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 (N1 sau N2 vs. N) (Mihaila și colab., 2021).*

CAPITOLUL 2

INVESTIGAREA CAPACITĂȚII NEUTROFILELOR N2 DE A INDUCE POLARIZAREA MACROFAGELOR ÎNTR-UN FENOTIP REPARATOR (MERTK+)

Cel de-al doilea studiu a avut drept scop investigarea capacității reparatorie a neutrofilelor N2 de a induce polarizarea macrofagelor către un fenotip reparator (MerTK+) și a avut trei obiective principale: (i) evaluarea efectului mediatorilor eliberați de subtipurile de neutrofile asupra modulării fenotipice a macrofagelor, (ii) determinarea impactului neutrofilelor N1/N2 asupra ererocitozei macrofagelor, precum și (iii) investigarea mecanismelor moleculare implicate în reprogramarea macrofagelor.

În acest sens, neutrofilele murine izolate din maduva osoasă au fost polarizate în subtipurile N1 și N2 timp de 2 ore. După această perioadă de stimulare, mediul inițial a fost înlocuit cu un mediu fără stimulatori, iar celulele au fost menținute în cultură pentru încă 18 ore. La finalul timpului de incubare, mediile condiționate (secretomul), care conține factorii

eliberați de neutrofilele N1/N2, au fost colectate și utilizate pentru a trata macrofagele obținute prin diferențierea monocitelor din linia celulară THP-1. Analiza macrofagelor expuse la secretomul neutrofilelor N1/N2 a evidențiat un răspuns dinamic al acestora, ele adoptând fenotipuri diferite. Astfel, secretomul provenit de la neutrofilele N1 a favorizat un răspuns proinflamator macrofagelor, asemănător macrofagelor M1, evidențiat prin creșterea expresiei unor markeri proinflamatori precum TNF-α, IL-1β și S100A8/A9. În schimb, factorii eliberați de neutrofilele N2 a determinat o expresie crescută a markerilor antiinflamatori CD206, TGF-β și IL-10 în macrofagele tratate, sugerând că acest secretom induce un fenotip de tip M2, asociat cu rezoluția inflamației și repararea tisulară.

Analiza qRT-PCR a evidențiat că macrofagele expuse secretomului provenit de la neutrofile N2 au prezentat o expresie crescută a unor receptori care se cunosc a fi implicați în eferocitoză – MerTK, CD36, CXCR1 și integrina αV/β5 (***Figura 5***) – precum și a moleculelor punte MFG-E8, Gas6 și proteina S, care mediază legătura dintre acești receptori și fosfatidilserina de pe suprafața celulelor apoptotice. Prin Western Blot au fost analizate formele fosforilate ale proteinelor ERK1/2 și p38 MAPK, pentru a investiga mecanismele de semnalizare activate de mediatorii eliberați de neutrofile în macrofage. Rezultatele au indicat că ERK1/2 a fost activat în macrofagele expuse la secretom N2, în timp ce pp38MAPK a fost reglat negativ.

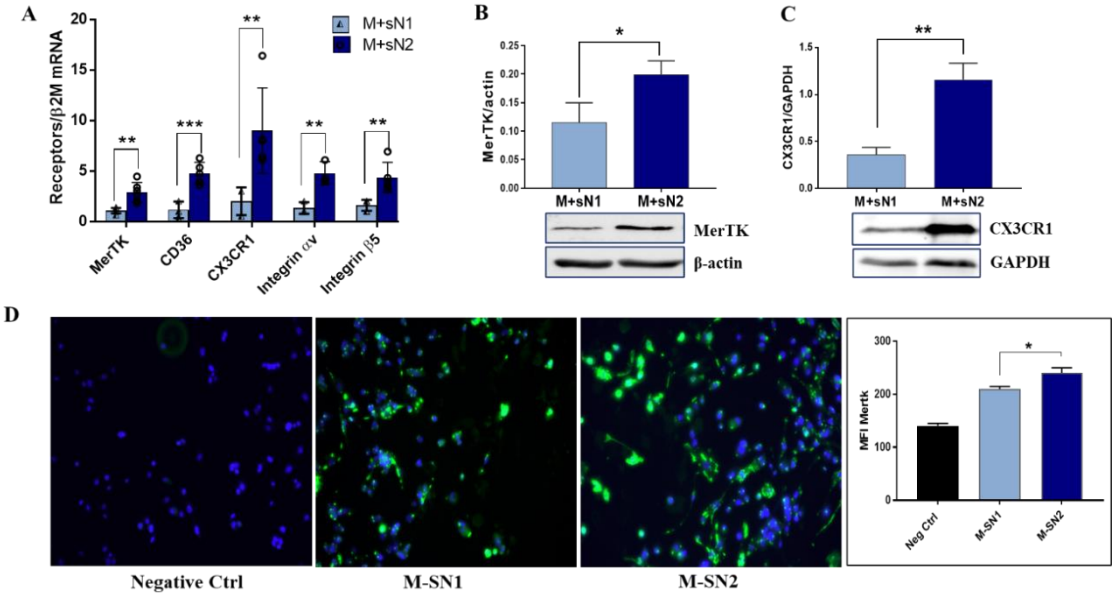


Figura 5. Factorii eliberați de neutrofilele N2 au indus creșterea receptorilor de eferocitoză ai macrofagelor. *(**A**) Expresiile genice ale MerTK, CD36, CX3CR1, integrinei αV și β5 în macrofagele expuse la secretomul colectat din neutrofile N1 (M + sN1) sau N2 (M + sN2). (**B, C**)*

*Expresiile proteice ale MerTK și CX3CR1 în lizatul macrofagelor M + sN1 și M + sN2. Datele reprezintă media ± SD a trei experimente diferite; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (M + sN1 versus M + sN2).* ***(D)*** *Imagini reprezentative ale expresiei de suprafață a MerTK pe macrofagele expuse la secretomul N1/N2, prin colorare prin imunofluorescență cu verde (MerTK) și cyan (DAPI-nuclei celulari), precum și graficul de cuantificare a intensității medie de fluorescență (MFI)(Mihaila și colab., 2024).*

Mai mult, expresia genică a factorilor de trancripție PPARγ, KLF4 și Nur77 a fost crescută în macrofagele expuse la secretom N2 comparativ cu macrofagele expuse la secretomul N1, sugerând o reglare distinctă a fenotipului macrofagelor în funcție de tipul de neutrofile care secretă mediatorii (***Figura 6***).

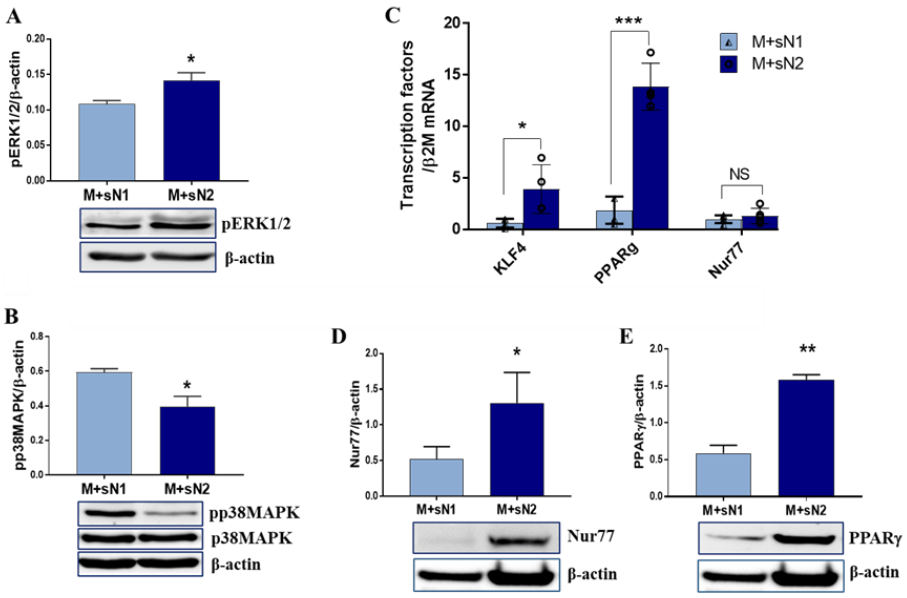


Figura 6. Mecanismul de semnalizare declanșat de mediatorii N2 a activat ERK1/2 și factorii de transcripție asociați cu macrofagul reparator. ***(A, B)*** *Analiza Western blot a arătat că pERK1/2 și pp38MAPM au fost activate diferit de neutrofilele N1/N2. Rezultatele analizei densitometrice sunt prezentate ca medii ± SD (n = 3).* ***(C)*** *Expresiile ARNm ale KLF4, PPARγ și Nur77 în macrofage după incubarea cu secretomul neutrofilelor N1/N2. Expresia relativă a ARNm este prezentată ca medii ± SD (n = 3).* ***(D, E)*** *Analiza Western blot a factorilor de transcripție Nur77 și PPAR-γ ai macrofagelor expuse la secretom de neutrofile N1 sau N2. Rezultatele analizei densitometrice sunt prezentate ca medii ± SD (n = 3). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (Mihaila și colab., 2024).*

De asemenea, datele obținute în cel de-al doilea studiu demonstrează că factorii eliberați de subsetul antiinflamator de neutrofile (prezente în faza reparatorie post-IM) induc un

fenotip de macrofag pro-vindecare, cu o activitate crescută a eferocitozei, așa cum arată rezultatele de imunofluorescență (***Figura 7***).

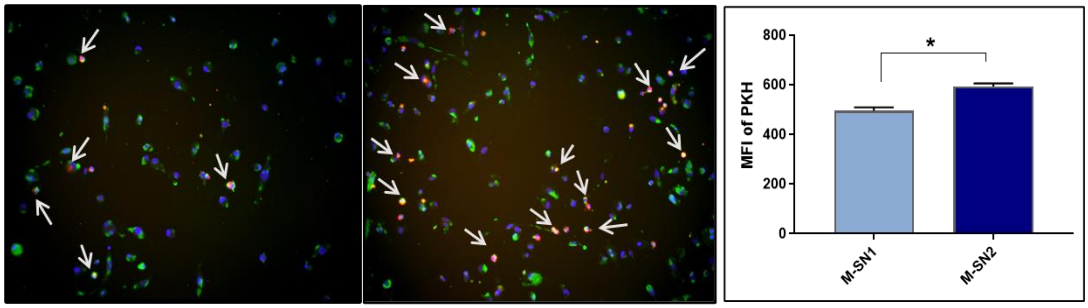


Figura 7. Macrofagele expuse la secretomul neutrofilelor N2 înglobează cardiomiocitele apoptotice. *Microscopia de fluorescență care arată preluarea cardiomiocitelor apoptotice (marcate cu PKH-roșu) de către macrofagele umane expuse anterior la secretomul neutrofilelor N1/N2. Macrofagele au fost co-incubate cu celule apoptotice timp de 2 ore, apoi colorate pentru receptorii MerTK (verde). Nucleii sunt marcați cu DAPI (albastru). Săgețile albe indică colocalizarea corpurilor apoptotice cu receptorul MerTK al macrofagelor, evidențiind eferocitoza cardiomiocitelor apoptotice. Graficul de cuantificare arată intensitatea medie de fluorescență a colorantului PKH, indicând eficiența înglobării cardiomiocitelor apoptotice (n = 3, *p < 0,05) (Mihaila și colab., 2024).*

CAPITOLUL 3

INVESTIGAREA EFECTULUI TERAPIEI CU FACTORI ELIBERAȚI DE NEUTROFILELE N2 ÎNTR-UN MODEL DE ȘOARECE CU INFARCT MIOCARDIC

Acest studiu a avut ca scop investigarea potențialului terapeutic al secretomului provenit de la neutrofile N2 într-un model de șoarece cu infarct miocardic, iar obiectivele principale ale acestui studiu au fost: (i) evaluarea efectului terapeutic al secretomului provenit de la neutrofile N2 asupra inflamației sistemice și remodelării tisulare post-infarct miocardic la șoareci, (ii) compararea impactului secretomului N1 și N2 asupra expresiei genice a unor markeri inflamatori și pro-fibrotici, precum și asupra depunerii de colagen în zona infarctată și (iii) determinarea modificărilor la nivel plasmatic ale proteinelor inflamatorii pentru a caracteriza profilul inflamator sistemic post-tratament. Astfel, neutrofilele murine au fost

izolate, polarizate și utilizate pentru obținerea secretomului, conform protocolului descris în studiul anterior. Șoarecii masculi din linia C57BL/6J au fost supuși unei proceduri chirurgicale pentru inducerea infarctului miocardic (***Figura 8***), iar ulterior li s-a administrat secretom concentrat de neutrofile N1/N2.

Figura 8. Principalele etape în obținerea modelului murin de infarct miocardic: *(**1**) Șoarecii au primit analgezic și anestezic (ketamină 80 mg/kg, xilazină 10 mg/kg). (**2**) O incizie de 0,5 cm a fost realizată la nivelul gâtului, mușchii și fasciile fiind îndepărtate. Canula a fost introdusă cu atenție, conectându-se la ventilator pentru ventilația artificială (**3**) O incizie de 1 cm a fost realizată la nivelul toracelui (**4**), iar toracotomia a permis expunerea inimii. (**5**) Artera LAD a fost ligată permanent folosind un fir de mătase 7-0 pentru a induce infarctul miocardic. (**6**)Cavitatea toracică a fost închisă, (**7, 8**) iar șoarecii au fost plasați pe o pernă încălzită pentru recuperare.*

Pentru a confirma inducerea infarctului miocardic, la 24 de ore post-operație am evaluat prin imunofluorescență infiltrarea neutrofilelor (***Figura 9***) și nivelul de expresie a markerilor proinflamatori în regiunea afectată a ventriculului stâng, folosind Real-time PCR.

Pentru a investiga rolul factorilor solubili eliberați de neutrofilele N1/N2 în procesul de reparare a țesutului post-infarct miocardic, secretomul a fost injectat în zona ischemică imediat după realizarea ligaturii arterei coronare. La 7 zile post-infarct, inimile și probele de sânge ale șoarecilor au fost recoltate și analizate pentru a evalua impactul acestui tratament. Expresia unor markeri proinflamatori (Il-6, IL-1β și MCP-1) și pro-fibrotici (CCN2, CCN5

și αSMA) a fost ușor scăzută la șoarecii tratați cu secretom N1/N2 comparativ cu șoarecii netratați.

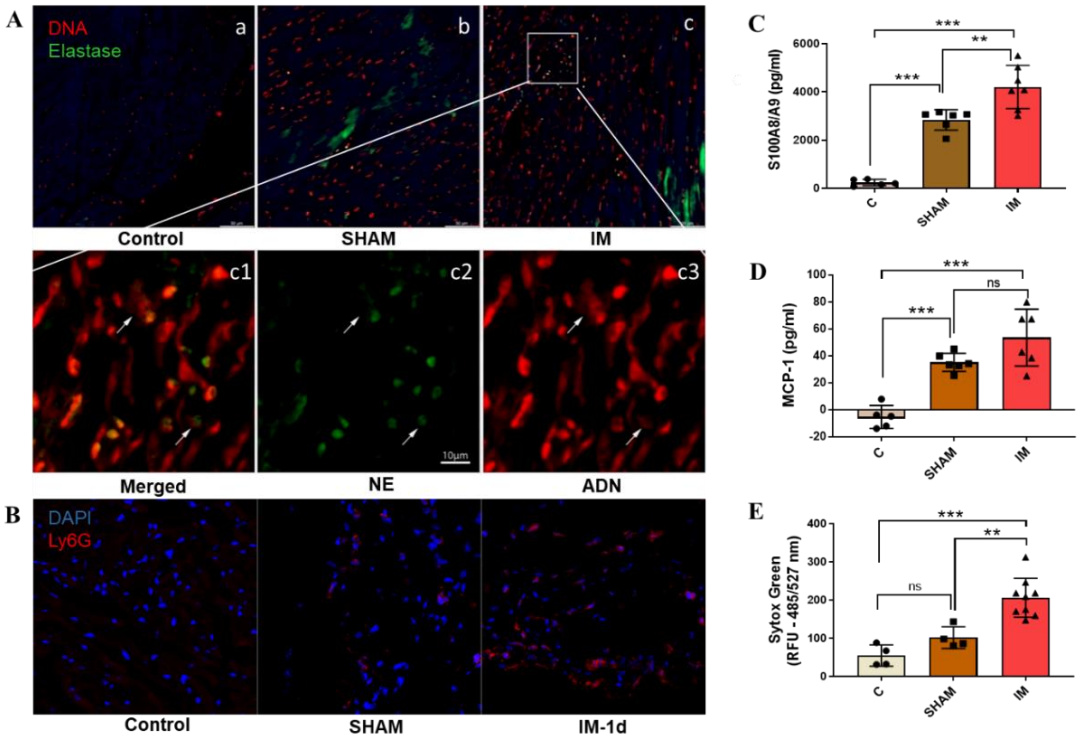


Figura 9. Markeri locali și sistemici ai activării neutrofilelor în IM acut. *(**A**) Imagini reprezentative ale elastazei neutrofilice (verde) în țesutul cardiac de șoarece control (a), SHAM (b) sau (c) șoareci cu IM. ADN-ul este colorat cu roșu. Bara de scară este de 50 µm pentru imaginile a, b și c și de 10 µm pentru imaginile c1-c3. Imaginile c1-c3 arată o zonă mărită din imaginea c unde sunt vizibile neutrofilele infiltrate și NET-uri. **(B)** Imunofluorescența markerului de neutrofile Ly6G (roșu) în țesutul cardiac de șoarece control, SHAM sau șoareci cu IM. Nucleii sunt colorați cu DAPI (albastru). **(C, D)** Nivelurile proteinelor S100A8/A9 și MCP-1 în plasma șoarecilor control, SHAM sau cu IM, așa cum au fost evaluate prin test ELISA. **(E)** Prezența ADN-ului în plasma șoarecilor control, SHAM sau cu IM, după colorarea fluorescentă cu Sytox Green. n=4-6, **p<0,01, ***p<0,001. Datele sunt reprezentate ca medie ± SD (manuscris trimis spre publicare, Ciortan, Mihaila și colab., 2025).*

Administrarea secretomului provenit de la neutrofile polarizate a influențat faza reparatorie post-infarct prin reducerea numărului de miofibroblaste și a infiltrarii de leucocite, evidențiate prin scaderea de αSMA și MPO în zona fibrotică a leziunilor infarctului, conform analizelor de imunofluorescență (***Figura 10***).

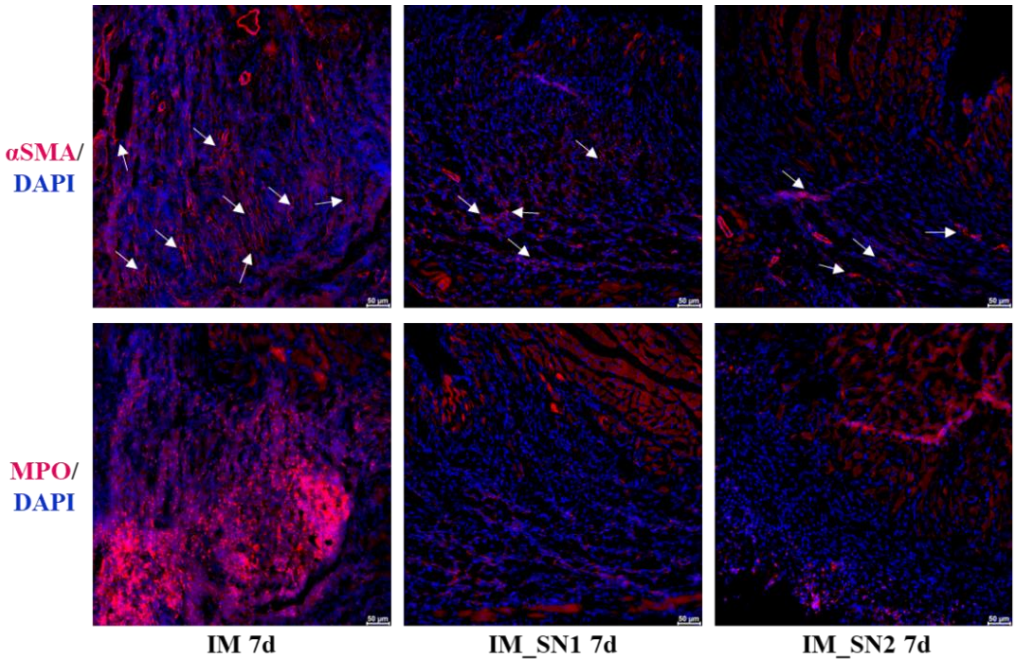


Figura 10. *Analiza imunofluorescentă a unor markeri asociați cu fibroza și infiltrarea neutrofilelor în țesutul cardiac al șoarecilor IM, IM_SN1 și IM_SN2, la 7 zile după ischemie. αSMA (marker de miofibroblast) și MPO (marker specific neutrofilelor) marcate în roșu, nucleii celulari sunt marcați cu DAPI (albastru) (manuscris trimis spre publicare, Ciortan, Mihaila și colab., 2025).*

În plus, analiza histologică a secțiunilor colorate cu Picrosirius Red a evidențiat o reducere a depunerilor de colagen la șoarecii cu IM injectați cu secretom N2 comparativ cu șoarecii injectați cu secretom N1 sau șoarecii netratați (***Figura 11***).

Figura 11. *Colorare cu Picrosirius Red a secțiunilor de țesut cardiac, recoltate de la șoareci cu IM sau șoareci cu IM tratați cu SN1/SN2, la 7 zile după ischemie. Zonele roșii indică prezența colagenului. Bară de scară=1 mm (manuscris trimis spre publicare, Ciortan, Mihaila și colab., 2025).*

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII ORIGINALE

Rezultatele obținute în cele trei studii susțin ideea că neutrofilele sunt celule imune heterogene, cu profiluri transcripționale și funcționale distincte, reflectând roluri variate în contextul inflamației și reparației tisulare. Așa cum reiese din **primul studiu** din această teză de doctorat, neutrofilele N1 au un profil proinflamator, caracterizat printr-o producere crescută de citokine și chemokine inflamatorii, niveluri ridicate de ROS, NO, activitate enzimatică intensă și capacitate migratorie crescută, în timp ce neutrofilele N2 au un profil genic și funcțional asociat cu rezoluția inflamației. Acestea produc citokine și chemokine antiinflamatorii, produc niveluri scăzute de ROS, NO, au o activitate enzimatică diminuată și o chemotaxie redusă. Blocarea lui S100A9 a diminuat caracterul inflamator al subpopulației N1, sugerând o potențială cale terapeutică.

Rezultatele celui de-al **doilea studiu** au arătat că neutrofilele N2 au capacitatea de a modula fenotipul macrofagelor spre unul pro-reparator prin factorii solubili secretați de acestea. În acest studiu s-a demonstrat că secretomul N2 induce expresia unor receptori implicați în procesul de eferocitoză (MerTK, CD36, CXCR1, integrina αv/β5), precum și a moleculeor punte (MFG-E8, Gas6, proteina S) în macrofage, favorizând eliminarea eficientă a celulelor apoptotice și promovând astfel vindecarea tisulară.

Cel de-**al treilea studiu** vine să confirme aceste efecte benefice ale secretomului N2 într-un model murin de infarct miocardic. Conform datelor obținute, administrarea locală a secretomului N2 a dus la reducerea infiltrării leucocitelor (evidențiată prin scăderea markerului neutrofilic MPO), reducerea numărului de miofibroblaste (evidențiată prin scăderea markerului specific α-SMA), dar și prin scăderea depunerii de colagen, sugerând o atenuare a procesului fibrotic. Aceste efecte susțin rolul reparator al neutrofilelor N2 și potențialul lor terapeutic în limitarea remodelării excesive a țesutului cardiac.

Studiile realizate în cardul acestei teze prezintă câteva **limitări** importante care trebuie luate în considerare. Unul dintre aceste limitări este faptul că sistemele noastre experimentale din primul și din cel de-al doilea studiu sunt simplificate și este puțin probabil să reproducă pe deplin complexitatea mediului care se regăsește în zona infarctată (*in vivo*). De asemenea, studiile se concentrează pe subtipurile de neutrofile N1/N2, însă există mai multe subtipuri de neutrofile care pot avea roluri diferite în diverse faze ale inflamației și în remodelarea post-infarct, așa cum au arătat Vafadarnejad și colaboratorii săi (Vafadarnejad

și colab., 2020). Așadar, o examinare mai extinsă a acestor subtipuri de neutrofile este necesară. O limitare semnificativă care se regăsește în ultimul studiu din această teză o reprezintă numărul redus de animale utilizate în fiecare grup experimental. Deși rezultatele arată un potențial rol imunomodulator al secretomului provenit de la neutrofile asupra inflamației post-infarct, acestea trebuie validate pe un număr mai mare de animale. De asemenea, este necesară o analiză extinsă care să vizeze diferite momente experimentale pentru a analiza dinamica răspunsului inflamator și impactul secretomului administrat asupra remodelării cardiace pe termen lung.

Rezultatele prezentate în cadrul acestei teze de doctorat au fost obținute cu sprijinul proiectelor de cercetare INNATE-MI (PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0172) și PN-III-P2.1-PED-2019-4906 și reflectă efortul comun al echipei de cercetare din cadrul laboratorului de Inflamație al Institutului de Biologie și Patologie „Nicolae Simionescu”.

Bibliografie

1. Ciortan, L., Gan, A.M., Cecoltan, S., Serbanescu, M., Mihaila, A.C., Macarie, R.D., Tucureanu, M., Naie, M.L., Preda, M.B., Bila, G., Bilyy, R., and Butoi, E., 2025. Factors released by polarized neutrophils modulate fibroblast's inflammatory phenotype in vitro and limit the conversion of fibroblast to myofibroblasts post-myocardial infarction. Manuscris trimis spre publicare la *Cell Communication and Signaling*.
2. Denny, M.F., Yalavarthi, S., Zhao, W., Thacker, S.G., Anderson, M., Sandy, A.R., McCune, W.J. and Kaplan, M.J., 2010. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *The journal of immunology*, *184*(6), pp.3284-3297.
3. Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S. and Albelda, S.M., 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-β:"N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell*, *16*(3), pp.183-194.
4. Hong, C.W., 2017. Current understanding in neutrophil differentiation and heterogeneity. *Immune network*, *17*(5), p.298.
5. Kloc, M., Ghobrial, R.M., Wosik, J., Lewicka, A., Lewicki, S. and Kubiak, J.Z., 2019. Macrophage functions in wound healing. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *13*(1), pp.99-109.
6. Kraus, R.F. and Gruber, M.A., 2021. Neutrophils—from bone marrow to first-line defense of the innate immune system. *Frontiers in immunology*, *12*, p.767175.
7. Kumar, S. and Dikshit, M., 2019. Metabolic insight of neutrophils in health and disease. *Frontiers in immunology*, *10*, p.2099.
8. Ma, Y., Yabluchanskiy, A., Iyer, R.P., Cannon, P.L., Flynn, E.R., Jung, M., Henry, J., Cates, C.A., Deleon-Pennell, K.Y. and Lindsey, M.L., 2016. Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction. *Cardiovascular research*, *110*(1), pp.51-61.
9. Mihaila, A.C., Ciortan, L., Macarie, R.D., Vadana, M., Cecoltan, S., Preda, M.B., Hudita, A., Gan, A.M., Jakobsson, G., Tucureanu, M.M. and Barbu, E., 2021. Transcriptional profiling and functional analysis of N1/N2 neutrophils reveal an

immunomodulatory effect of S100A9-blockade on the pro-inflammatory N1 subpopulation. *Frontiers in immunology*, *12*, p.708770.

10. Mihaila, A.C., Ciortan, L., Tucureanu, M.M., Simionescu, M. and Butoi, E., 2024. Anti-inflammatory neutrophils reprogram macrophages toward a pro-healing phenotype with increased efferocytosis capacity. *Cells*, *13*(3), p.208.
11. Nahrendorf, M., Pittet, M.J. and Swirski, F.K., 2010. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*, *121*(22), pp.2437-2445.
12. Ojha, N. and Dhamoon, A.S., 2023. Myocardial infarction. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
13. Prabhu, S.D. and Frangogiannis, N.G., 2016. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis. *Circulation research*, *119*(1), pp.91-112.
14. Schloss, M.J., Horckmans, M., Nitz, K., Duchene, J., Drechsler, M., Bidzhekov, K., Scheiermann, C., Weber, C., Soehnlein, O. and Steffens, S., 2016. The time-of-day of myocardial infarction onset affects healing through oscillations in cardiac neutrophil recruitment. *EMBO molecular medicine*, *8*(8), pp.937-948.
15. Shrivastava, R. and Shukla, N., 2019. Attributes of alternatively activated (M2) macrophages. *Life sciences*, *224*, pp.222-231.
16. Silvestre-Roig, C., Fridlender, Z.G., Glogauer, M. and Scapini, P., 2019. Neutrophil diversity in health and disease. *Trends in immunology*, *40*(7), pp.565-583.
17. Sun, B., Wang, L., Guo, W., Chen, S., Ma, Y. and Wang, D., 2023. New treatment methods for myocardial infarction. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *10*, p.1251669.

Annals of R.S.C.B., Vol. XIX, Issue 2, 2015, pp. 33 - 40
Received 13 March 2015; accepted 06 April 2015.
doi: 10.ANN/RSCB-2015-0005:RSCB

The expression of translin is regulated by inflammatory stimuli in monocytes and macrophages

E. V. FUIOR [(1)], I. M. FENYO [(1)] and A. V. GAFENCU [(1)*]
[1] *Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" of the Romanian Academy*
**Corresponding author:*
Anca V. Gafencu, PhD
Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" of the Romanian Academy
8, B.P. Hasdeu Street, 050568, Bucharest, Romania
Phone: +(40)021.319.4518; e-mail: anca.gafencu@icbp.ro

Keywords. Translin, monocyte, macrophage, inflammation, aspirin, dexamethasone.

Summary

Translin and translin-associated factor X are two highly conserved proteins with nucleic acid binding activities, which are considered to act as a sensor for cell survival and proliferation in various normal and stress-related conditions. Despite the progresses made in the characterization of their function, their physiological role is still elusive. In this work we show how translin expression is regulated in vitro in monocytes upon applying various differentiation stimuli, of significance to inflammatory processes. In addition, in animal studies, translin was found to be upregulated by aspirin and dexamethasone in mouse peritoneal macrophages. The data presented herein may indicate translin as a potential sensor or target for inflammation.

Introduction

Translin (Tsn) was discovered in 1995 as a single-stranded DNA-binding protein recognizing the sequences at chromosomal translocations breakpoints responsible for certain types of lymphomas (Aoki et al., 1995). Its murine homologue was independently identified as a RNA-binding protein in tissues with intense mRNA transport, such as brain and testis (Han *et al.*, 1995). Translin knock-out mice were viable, with no evident phenotypical changes, except being smaller than the wild-type individuals. Noteworthy, they exhibited a significant delay in the formation of spleen hematopoietic colonies after sublethal ionizing radiation (Fukuda *et al.*, 2008). It was found that translin functions in partnership with its highly homologous protein, translin-associated factor X, known as TRAX/Tsnax (Aoki *et al.*,1997). Their amino acid sequences are highly conserved in eukaryotes (Gupta *et al.*, 2012) and their partnership is rather highly preserved phylogenetically, from humans to Drosophila (Claussen *et al*., 2006) and S. pombe (Laufman *et al.*, 2005). This tandem of proteins was described as being an important switch or sensor in cell proliferation and survival in normal and stressed cells via changing its cellular localization or the ratio between the two components (Chennathukuzhi *et al.*, 2003; Yang *et al*., 2004). TRAX is endowed with a nuclear localization signal, while translin has a functional nuclear export signal, both taking part in a complex translocation to and from the nucleus in certain conditions (Cho *et al*., 2004). Translin/TRAX were found to act as glucose response element binding proteins (GRBP) in the liver (Wu *et al*., 2003). Recently, nucleic acid binding sites were described also on TRAX (Gupta and Kumar, 2012). There are many reports regarding the involvement of the two proteins in RNA interference processes. The most exciting discovery relates to their heteromeric association under the naming of C3PO, which acts as an endoribonuclease that promotes

doi: 10.ANN/RSCB-2015-0005:RSCB

RNA interference via facilitation of RNA Interference Silencing Complex (RISC) activation (Liu *et al.*, 2009). Despite the numerous reports regarding the pleiotropic activities from RNA trafficking to DNA repair and recombination, puzzling aspects remain to be elucidated, to further define the physiological activity of this protein couple.

Atherosclerosis, the leading cause of death in the world, is a chronic disease of the arteries, leading to the formation of characteristic plaques. Both lipid metabolism dysregulation and a pro-inflammatory status contribute to the evolution of the disease. Monocytes and macrophages participate in all the events leading to the establishment of the plaque (accumulation of lipids, release of pro-inflammatory and cytotoxic factors, remodeling of extracellular matrix). Plaque monocytes and macrophages are rather heterogeneous, the various subsets displaying different functions in atherogenesis (Fenyo and Gafencu, 2013). Within the atheromatous site, macrophages differentiate, proliferate and undergo apoptosis. Monocyte differentiation to macrophages aggravates atherosclerosis by establishing an inflammatory milieu within the vascular wall. Oxidative stress greatly influences the behaviour of both monocytes (priming, adhesion, recruitment) and macrophages (differentiation, activation, polarization, death) (Tavakoli and Asmis, 2012), thus contributing to the lesional state.

In this work we have focused on the modulation of translin gene expression by certain differentiation or pro- or anti-inflammatory stimuli in monocytes and macrophages. We have found that these signals modulate translin expression, suggesting that this protein may be a promising sensor or target in inflammatory processes.

Materials and methods

Chemicals: Taq DNA polymerase was purchased from Promega (Madison, WI, USA); M-MLV Reverse Transcriptase was from Invitrogen (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD); DMEM, RPMI-1640, fetal calf serum and TRIzol Reagent were from Invitrogen; ECL Western blotting kit was from Pierce (Rockford, USA); tetradecanoyl phorbol acetate (TPA) was from Promega corp. (Madison, WI,USA); lipopolysaccharide (LPS) was from SIGMA. The primers were obtained from Metabion Inc. (Martinsried, Germany). An aliquot of anti-translin antibody was kindly provided by Dr. Manor from the Department of Biology, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel. All other antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, United States). U937, RAW264.7 were from ATCC, VA, USA. Streptavidine-Texas Red was from Amersham.

Cell culture: U937 human monocytes (5x105cells/mL) were grown in RPMI, supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum, in the presence of 100 μg/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin, at 37oC in a 5% CO2 incubator. The cells were differentiated with 120 nM PMA for 72 hours. Treatment with H2O2 0.5 mM was for 30', after which medium was replaced with fresh medium. Cells were harvested one day after the treatment was finished either for total, cytosolic or nuclear cell lysate or RNA preparation. RAW 264.7 murine macrophages (3x105) were grown in DMEM, supplemented with 10% fetal calf serum, in the presence of 100 μg/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin, at 37oC in a 5% CO2 incubator and treated with various stimuli.

Cell lysates preparation: For whole lysates preparation, after washing in phosphate buffer saline (PBS), cells were harvested in 2X electrophoresis loading buffer, as described by Laemmli (Laemmli, 1970).

Nuclear/ cytosolic fraction preparation: Nuclear extracts were prepared according to Dignam (Dignam et al., 1983). The cell pellets obtained by centrifugation at 3000 g for 5' were resuspended in lysis buffer (7 mM phosphate buffer, 1% Triton X-100 containing a cocktail of protease inhibitors). The suspension was passed through the needle of an insulin syringe. The lysate was

doi: 10.ANN/RSCB-2015-0005:RSCB
Received 13 March 2015; accepted 06 April 2015.

centrifuged at 750 g, for 10 min at 4ºC. The pelleted nuclei were resuspended in Laemmli buffer. The supernatants, representing the cytosolic fractions were precipitated with trichloracetic acid to a final concentration of 13.5%. After centrifugation at 12000 g for 10 min, pelleted cytosolic proteins were briefly washed with trichloracetic acid 10% to remove detergent traces and then solubilized in Laemmli buffer.

Protein assay: Protein concentrations were calculated according to the method of Sheffield (Sheffield *et al*., 1987), using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

SDS-PAGE was performed in 12% polyacrylamide gels. On each lane 45 µg of protein were loaded.

Western blot. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose in a semi-dry system (BIO-RAD). The blots were probed with anti-translin antibody or anti-actin antibody, followed by horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies. The protein bands were detected using ECL chemiluminescence technique as described by the manufacturer.

RT-PCR: Total RNA was prepared using TRIzol reagent according to the manufacturer instructions. From 1µg total RNA, cDNA was synthesized using oligo(dT)12-18 and M-MLV Reverse Transcriptase. PCR reactions were performed with the specific primers whose sequence is given in Table 1. The PCR Program was as follows: denaturation at 95ºC for 3'; 28 cycles of (denaturation: 95ºC, 30''; annealing: 55ºC, 30''; elongation: 72ºC, 30''); final elongation at 72ºC for 5'. The products were separated on 1.5% agarose gels, stained with Midori Green (Nippon Genetics) and analyzed by TotalLab Software.

Immunofluorescence: RAW 264.7 murine macrophages were seeded in 4-wells culture dishes on coverslips at 3x105 cells/mL. The following day, cells were incubated with the stimuli and fixed with methanol at the end of the treatment. After blocking with 1% BSA, samples were incubated sequentially with rabbit anti-translin antibody, anti-rabbit-biotin and Streptavidine-Texas Red, with appropriate washes in between. Lastly, the coverslips were mounted on microscope slides and viewed with a Nikon Microscope equipped with fluorescence accessories and camera.

Mouse models: Male C57BL/6 mice (Charles River Laboratories) were grown and fed rodent chow diet with ad libitum access to nutrients and water; they were exposed to a 12h cycle of light and dark. At the age of 10 weeks, animals were divided into the following experimental groups (n represents the number of individuals in each group):

1) Control mice which received 50µL/ water/mice/day, by gavage, for a 3 week period (n = 6).

2) Mice treated with aspirin (SIGMA): 100 µL/mice/day (dose 30 µg/mL in water) by gavage, for a period of 3 weeks (n=6);

3) Mice treated with dexamethasone (SIGMA): 100 µL/mice/day (dose 30mg/kg body weight) by gavage, for one week period (n=5).

At the end of the treatment period, at the age of 13 weeks, animals were injected i.p. with 1.5 ml thioglycolate to elicit peritoneal macrophages. After 72h from injection, animals were sacrificed through cervical dislocation, followed by harvesting through peritoneal lavage with 1‰ glucose-DMEM.

The experiments on animal models were performed in accordance with the provisions of EU Directive 86/609 in use at the time experiments were performed and of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS no. 123), and were approved by the ethical committee of our institution.

Table 1. Primers for gene expression analysis by RT-PCR.

Primer	Sequence	Expected size of the amplified fragment (bp)
Human Tsn-F	5'-TGGCAGCATTTGTTGTGTATTTGG	223
Human Tsn-R	5'-TTGATGAAGGTGGAGATGTGGAGG	
Human/mouse GAPDH-F	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC	452
Human/mouse GAPDH-R	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA	
Mouse Tsn-F	5'-CATTGGCGGTTCGTGCTTCAG	404
Mouse Tsn-R	5'-GCCGCTGCTGTCTCCTTATTG	

Results and discussions

First, we evaluated translin expression in RAW 264.7 murine macrophages upon medium (hours) / long (days) exposure to certain stimuli, significant to the inflammatory status. Thus, we incubated RAW 264.7 cells with (i) 30 nM TPA (3h), (ii) 1.6μM TPA (3h), (iii) 1μg/mL LPS (3h), and (iv) 0.5 mM H_2O_2 in Hanks buffer in the presence of Fe^{2+}, when free $HO\cdot$ radicals are generated (30 min). After 30 min of H_2O_2 treatment, the medium was changed and cells were let to recover for 2h. Finally, cells were either subjected to immunofluorescence as described in the Materials and Methods section or total RNA was isolated and translin expression was evaluated by semi-quantitative RT-PCR, using GAPDH as reference. We have noticed a slight increase in the level of translin mRNA upon exposure to TPA (30 nM or 1.6 μM), LPS or H_2O_2 (1.34, 1.54, 1.2 respectively 1.34 fold increase, illustrated in Figure 1A). These data correlated with the increased fluorescence intensity of the treated cells probed with anti-translin antibody (Figure 1B). A cytosolic localization of the protein was evidenced in both control and stressed cells. No nuclear shuttling was apparent under the experimental conditions. When TPA treatment was prolonged up to 24 hours, RT-PCR experiments indicated a level close to the control (1.1 fold increase; data not shown).

Then, we have used a different experimental model, the human U937 monocytes which upon prolonged TPA treatment differentiate into macrophages, changing also their phenotype from non-adherent to adherent. The cells were incubated with 120 nM TPA for 72 hours, when all the cells became adherent. Upon this treatment, translin expression was significantly decreased, as revealed by Western blot (Figure 2A) and RT-PCR (Figure 2B). Also, the effect of reactive oxygen species was assessed, in the absence or in the presence of TPA (Figure 2A, 2B). When present, translin was still localized in the cytosol. Nuclear fractions were also probed for translin, but no protein was detected there (data not shown). Similar data were obtained in another monocytic cell line, THP-1 (not shown).

Annals of R.S.C.B., Vol. XIX, Issue 2, 2015, pp. 33 - 40
Received 13 March 2015; accepted 06 April 2015.
doi: 10.ANN/RSCB-2015-0005:RSCB

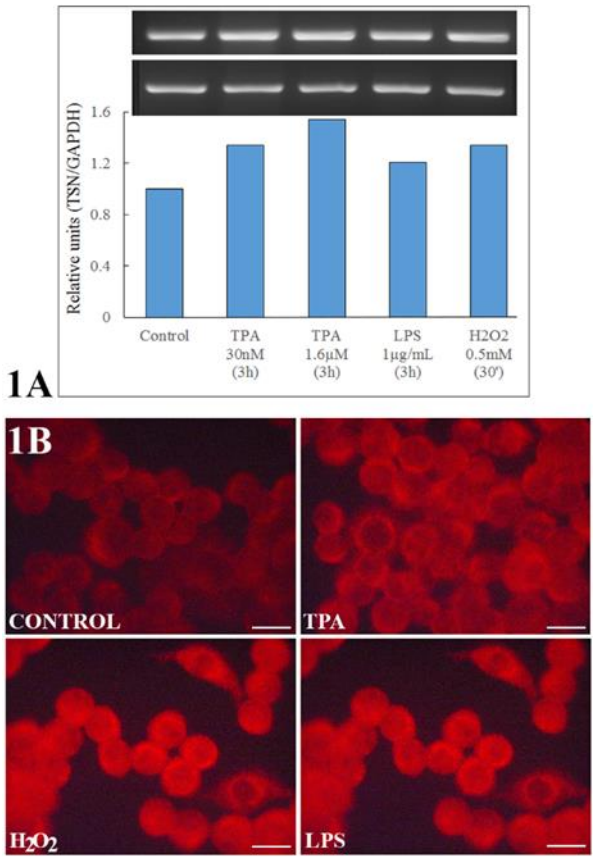


Figure 1. Translin expression in RAW 264.7 cells after medium term exposure to various stimuli. A. RAW 264.7 were incubated with TPA (30 nM or 1.6 µM) for 3h, LPS (1µg/mL) for 3h or H_2O_2 (0.5 mM) for 30 min. Total RNA was isolated and translin expression was semi-quantitated by RT-PCR; the upper and the lower bands represent translin, respectively GAPDH product. The graphed data represent the quantitation of the Midori Green-stained bands by TotalLab software; **B.** Immunofluorescence of RAW 264.7 cells incubated with TPA (30nM), LPS (1µg/mL) or H_2O_2 (0.5 mM) for the durations indicated in **A**. Cells were probed with anti-translin antibody, followed by anti-rabbit-biotin and Streptavidine-Texas Red and viewed with a fluorescence microscope. Bar is 10 µm.

Finally, we have also investigated the effect of certain anti-inflammatory agents on translin expression, in macrophages isolated from treated mice. To this aim, a non-steroidal (aspirin) and a steroid (dexamethasone) were administrated to C57BL/6 mice, as described in the Materials and Methods section. We have noticed that both compounds significantly increased translin expression in mouse peritoneal macrophages. Three-weeks treatment with aspirin, at a dose of 3µg/100µL/day or one-week treatment with dexamethasone (30mg/kg body weight), led to an increase of around 1.5-, respectively 2- fold, under the experimental conditions used. These values were found to be of statistical significance, based on t-test ($p<0.05$).

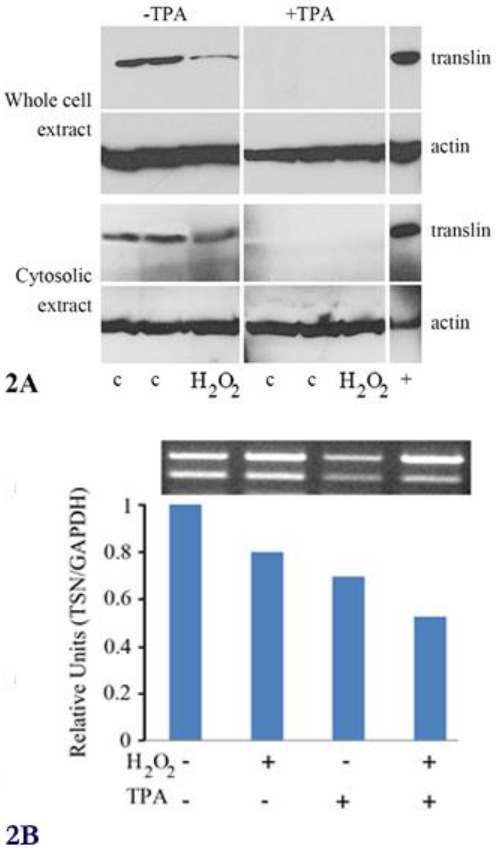


Figure 2. Translin expression in U937 human monocytes/macrophages. A. TPA and H2O2 decrease translin expression in U937 cells, but do not affect its cytosolic localization, as revealed by Western Blot. The last lane is loaded with a cell extract, used as positive control. B. Oxidative stress reduces translin expression in U937 human monocyte/macrophages, as assessed by RT-PCR. The upper and the lower bands represent GAPDH, respectively translin product. The graphed data represent the quantitation of the Midori Green-stained bands by TotalLab software.

Discussion

Translin is a single stranded-DNA and RNA binding protein. Since its discovery, many data accumulated regarding its function in DNA and RNA processing in partnership with TRAX. Its multitude of functions raises a question mark regarding its physiological role. Its high expression in myeloid and

doi: 10.ANN/RSCB-2015-0005:RSCB

lymphoid cells have opened a line of research in the field of hematopoietic differentiation. The differentiation of monocytes into macrophages involves mechanisms for inducing a response of the innate immune system to inflammatory challenges, such as pathogens or environmental stimuli. In this work we focused on the action of LPS, TPA or free radicals to investigate how they affect translin expression. We performed these studies in the context of the pro-inflammatory status, similar with that found in atheromatous sites.

Exogenous LPS induces a pro-inflammatory state which may contribute to the atherosclerosis progression. Recently, the synergy between dietary lipids, endogenous endotoxemia and low-grade inflammation, defined as "metabolic endotoxemia" was demonstrated to affect cardiovascular physiology (Laugerette et al., 2011). In our study, we have noticed a slight increase in translin expression upon 3h exposure of RAW 264.7 murine macrophages to LPS (Figure 1A, lane LPS). No modification of intracellular distribution of the protein was detectable by immunofluorescence (Figure 1B).

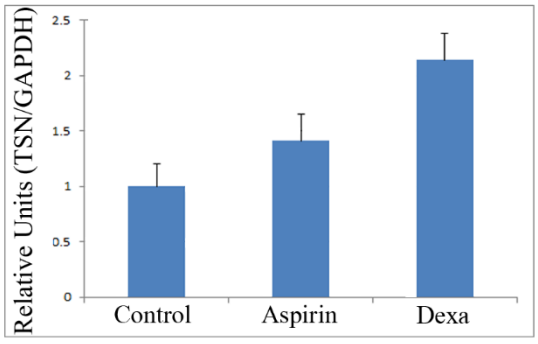


Figure 3. Anti-inflammatory agents upregulate translin expression in mouse peritoneal macrophages. Total RNA was isolated from peritoneal macrophages from mice treated with aspirin (3µg/ mouse /day for 3 weeks) or dexamethasone (30mg/kg body weight, for one week). Translin expression was measured by RT-PCR and the products separated on agarose gel were quantified using TotalLab software.

TPA can act as an activator of protein kinase C, and, based on this, it functions as a tumor promoter. It also induces the production of superoxide, but not other radicals in rat macrophages (Swindle *et al*., 2002). TPA is known to induce differentiation of human monocyte cell lines, like U937 or THP-1. In our experiments, short term exposure to TPA in RAW macrophages modestly increased translin level, in a dose-dependent manner (Figure 1A, TPA lanes), while TPA-induced differentiation of U937 monocytes drastically down-regulated translin expression, without affecting its cytosolic localization (Figure 2A).

Free radicals which aggravates plaque formation slightly increased translin expression in RAW cells, but decreased it in U937 cells, either when presented alone or in conjunction with other stimuli (TPA).

Excepting the drastic reduction of translin expression in TPA-differentiated U937 cells, most of the changes remained relatively modest. One may ask if these were of biological relevance, or whether they were at the limit of the experimental error. We believe that these studies need to be continued to find the doses or the period of exposure to induce a maximal perturbation.

More relevant changes we have recorded in mouse peritoneal macrophages upon anti-inflammatory treatments with non-steroidal or steroid compounds.

Aspirin is used in atherosclerosis therapy, as it reduces the risk for myocardial infarction; its effects on plaque stabilization are thought to mainly occur via two mechanisms: inhibition of matrix metalloproteinase (MMP)-9 and nuclear factor kB (NF-kB) and increased cholesterol efflux by enhanced expression of ATP-binding cassette transporter ABCA-1 and scavenger receptor SR-BI (Lu et al., 2010). In our study, we noticed that although in extremely low dose, aspirin administration to mice increased translin expression ~1.5 times in the peritoneal macrophages (Figure 4). Of course, since the aspirin treatment for cardiovascular pathologies in humans needs to be administered for long periods of time, it would be of interest to follow this experiment for an extended duration.

Dexamethasone, a synthetic ligand for the glucocorticoid receptor, is known for its differentiating effects on myeloid leukemia cells (Hicsonmez, 2006). It is also used in

doi: 10.ANN/RSCB-2015-0005:RSCB

various inflammatory conditions, including atherosclerosis. In our study, one-week treatment increased two-fold translin expression in mouse peritoneal macrophages.

The results presented herein show that different mechanisms may regulate translin expression in macrophages upon exposure to various inflammatory stimuli. As we have seen in Figure 2B, concomitant application of two stimuli (TPA and H2O2) had an additive effect upon decreasing translin expression. It would be now of interest to establish how certain signalling pathways affect the expression of this protein.

The data reported in this work show a modulation of translin expression in inflammatory circumstances. Similar results to our data obtained in TPA-differentiated U937 macrophages showing the significant reduction of translin were reported for another cell line, the erythroleukemic K562 (Fukuda *et al*., 2008).

These results are of importance to follow-up. An interesting hypothesis to verify would be that the involvement of translin/TRAX in monocyte differentiation may partly account for the effects exerted by certain anti-psychotic drugs. It was recently demonstrated that antipsychotic drugs induce immune regulation (Chen *et al*., 2013) It was found that, in rat cortex, translin was one of the few genes modulated by administration of imipramine and citalopram (Palotas *et al*., 2004), while TRAX expression was specifically increased by risperidone, but not by clozapine (Kedracka-Krok *et al*., 2014).

Conclusion

In this paper we presented some evidence for the modulation of the nucleic acid binding protein, translin, under exposure to pro- or anti-inflammatory stimuli. These studies open the avenue for investigating the potential of this protein as a sensor or a target in inflammatory conditions. We are confident that results presented in this work and future developments will lead to a better understanding of the involvement of translin in the cardiovascular pathology.

Acknowledgements

This work was supported by a grant of the Romanian National Authority for Scientific Research, National Research Council – Executive Agency for Higher Education, Research, Development and Innovation Funding (CNCS – UEFISCDI), PN-II-ID-PCE-2011-3-0591 (a grant awarded to A. Gafencu), and by the Romanian Academy, I.M. Fenyo acknowledges the support of the strategic grant POSDRU/159/1.5/S/133391 - financed by the European Social Found within the Sectorial Operational Program Human Resources Development 2007 – 2013.
We are deeply grateful to Dr. Manor of the Department of Biology, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel for providing us an aliquot of anti-translin antibody. We acknowledge the help of Dr. Ovidiu Croitoru with graphic design.

References

Aoki K, Suzuki K, Sugano T, Tasaka T, Nakahara K, Kuge O, Omori A, Kasai M. A novel gene, Translin, encodes a recombination hotspot binding protein associated with chromosomal translocations. Nat Genet, 10, 2, 167-74, 1995

Aoki K, Ishida R, Kasai M. Isolation and characterization of a cDNA encoding a Translin-like protein, TRAX. FEBS Lett., 401, 2-3, 109-12, 1997

Chen ML, Wu S, Tsai TC, Wang LK, Tsai FM. Regulation of macrophage immune responses by antipsychotic drugs. Immunopharmacol Immunotoxicol., 35, 5, 573-80, 2013

Cho YS, Chennathukuzhi VM, Handel MA, Eppig J, Hecht NB The relative levels of translin-associated factor X (TRAX) and testis brain RNA-binding protein determine their nucleocytoplasmic distribution in male germ cells. J Biol Chem., 279, 30, 31514-23, 2004

Claussen M, Koch R, Jin ZY, Suter B. Functional characterization of Drosophila Translin and Trax. Genetics, 174, 3, 1337-47, 2006

Chennathukuzhi V, Stein JM, Abel T, Donlon S, Yang S, Miller JP, Allman DM, Simmons RA, Hecht NB. Mice deficient for testis-brain RNA-binding protein exhibit a coordinate loss of TRAX, reduced fertility, altered gene expression in the brain, and behavioral changes.Mol Cell Biol., 23, 18, 6419-34, 2003

Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a

doi: 10.ANN/RSCB-2015-0005:RSCB

soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucleic Acids Res.11, 5:1475-89, 1983

Fenyo IM, Gafencu AV. The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. Immunobiology, 218, 11, 1376-84, 2013

Fukuda Y, Ishida R, Aoki K, Nakahara K, Takashi T, Mochida K, Suzuki O, Matsuda J, Kasai M. Contribution of Translinto hematopoietic regeneration after sublethal ionizing irradiation. Biol Pharm Bull., 31, 2 : 207-11, 2008

Gupta GD, Kale A, Kumar V. Molecular evolution of Translin superfamily proteins within the genomes of eubacteria, archaea and eukaryotes. J Mol Evol., 75, 5-6, 155-67, 2012

Gupta GD, Kumar V. Identification of nucleic acid binding sites on translin-associated factor X (TRAX) protein. PLoS One, 7, 3,e33035, 2012

Han JR, Gu W, Hecht NB Testis-brain RNA-binding protein, a testicular translational regulatory RNA-binding protein, is present in the brain and binds to the 3' untranslated regions of transported brain mRNAs. Biol Reprod., 53, 3, 707-17, 1995 Hiçsönmez G. The effect of steroid on myeloid leukemic cells: the potential of short-course high-dose methylprednisolone treatment in inducing differentiation, apoptosis and in stimulating myelopoiesis. Leuk Res. 30, 1, 60-8, 2006

Kedracka-Krok S, Swiderska B, Jankowska U, Skupien-Rabian B, Solich J, Buczak K, Dziedzicka-Wasylewska M. Clozapine influences cytoskeleton structure and calcium homeostasis in rat cerebral cortex and has a different proteomic profile than risperidone J Neurochem. doi: 10.1111/jnc.13007, 2014

Laemmli UK.Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 5;227(5259):680-5, 1970

Laufman O, Ben Yosef R, Adir N, Manor H. Cloning and characterization of the Schizosaccharomyces pombe homologs of the human protein Translinand the Translin-associated protein TRAX. Nucleic Acids Res. 2005 Jul 25;33(13):4128-39

Laugerette F, Vors C, Peretti N, Michalski MC.Complex links between dietary lipids, endogenous endotoxins and metabolic inflammation Biochimie 93, 1, 39-45, 2011

Liu Y, Ye X, Jiang F, Liang C, Chen D, Peng J, Kinch LN, Grishin NV, Liu Q. C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation. Science. 325, 5941, 750-3, 2009

Lu L, Liu H, Peng J, Gan L, Shen L, Zhang Q, Li L, Zhang L, Su C, Jiang Y. Regulations of the key mediators in inflammation and atherosclerosis by aspirin in human macrophages. Lipids Health Dis. 6, 9:16, 2010

Palotás M, Palotás A, Puskás LG, Kitajka K, Pákáski M, Janka Z, Molnár J, Penke B, Kálmán J. Gene expression profile analysis of the rat cortex following treatment with imipramine and citalopram. Int J Neuropsychopharmacol. 7, 4, 401-13, 2004

Sheffield JB, Graff D, Li HP. A solid-phase method for the quantitation of protein in the presence of sodium dodecyl sulfate and other interfering substances. Anal Biochem. 166, 1, 49-54, 1987

Swindle EJ, Hunt JA, Coleman JW. A comparison of reactive oxygen species generation by rat peritoneal macrophages and mast cells using the highly sensitive real-time chemiluminescent probe pholasin: inhibition of antigen-induced mast cell degranulation by macrophage-derived hydrogen peroxide. J Immunol. 169,10:5866-73, 2002

Tavakoli S, Asmis R. Reactive oxygen species and thiol redox signaling in the macrophage biology of atherosclerosis. Antioxid Redox Signal. 17, 12, 1785-9, 2012

Yang S, Cho YS, Chennathukuzhi VM, Underkoffler LA, Loomes K, Hecht NB. Translin-associated factor X is post-transcriptionally regulated by its partner protein TB-RBP, and both are essential for normal cell proliferation. J Biol Chem. 279, 13:12605-14, 2004

Wu RF, Osatomi K, Terada LS, Uyeda K. Identification of Translin/Trax complex as a glucose response element binding protein in liver. Biochim Biophys Acta 1624,1-3, 29-35, 2003.

Biochemical and Biophysical Research Communications 468 (2015) 190–195

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Thyroid hormones upregulate apolipoprotein E gene expression in astrocytes

Corina Roman [a], Elena V. Fuior [a], Violeta G. Trusca [a], Dimitris Kardassis [b], Maya Simionescu [a], Anca V. Gafencu [a, *]

[a] Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", Bucharest, Romania
[b] University of Crete Medical School and Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology of Hellas, Heraklion, Crete, Greece

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 October 2015
Accepted 24 October 2015
Available online 29 October 2015

Keywords:
apoE
Gene regulation
Astrocytes
Thyroid hormone receptor β
Retinoid X receptor
T3
9-*cis*-Retinoic Acid

ABSTRACT

Apolipoprotein E (apoE), a protein mainly involved in lipid metabolism, is associated with several neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease. Despite numerous attempts to elucidate apoE gene regulation in the brain, the exact mechanism is still uncovered. The mechanism of apoE gene regulation in the brain involves the proximal promoter and multienhancers ME.1 and ME.2, which evolved by gene duplication. Herein we questioned whether thyroid hormones and their nuclear receptors have a role in apoE gene regulation in astrocytes. Our data showed that thyroid hormones increase apoE gene expression in HTB14 astrocytes in a dose-dependent manner. This effect can be intermediated by the thyroid receptor β (TRβ) which is expressed in these cells. In the presence of triiodothyronine (T3) and 9-cis retinoic acid, in astrocytes transfected to overexpress TRβ and retinoid X receptor α (RXRα), apoE promoter was indirectly activated through the interaction with ME.2. To determine the location of TRβ/RXRα binding site on ME.2, we performed DNA pull down assays and found that TRβ/RXRα complex bound to the region 341–488 of ME.2. This result was confirmed by transient transfection experiments in which a series of 5′- and 3′-deletion mutants of ME.2 were used. These data support the existence of a biologically active TRβ binding site starting at 409 in ME.2. In conclusion, our data revealed that ligand-activated TRβ/RXRα heterodimers bind with high efficiency on tissue-specific distal regulatory element ME.2 and thus modulate apoE gene expression in the brain.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Apolipoprotein E (apoE) is a glycoprotein with a major involvement in lipid metabolism, mediating lipoprotein clearance from the plasma. Besides its role as a lipid carrier from astrocytes to neurons via cell surface receptors, apoE plays an important role in neurobiology and neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease (AD) [1]. Astrocytes are the principal apoE suppliers in the brain [2,3].

Studies regarding apoE gene expression revealed a complex network of interactions between regulatory elements, triggering cell-specific expression. Human apoE gene is located in apoE/apoCI/apoCI/apoCIV/apoCII gene cluster on chromosome 19 [4]. Two distal duplicated sequences, multienhancer 1 and 2 (ME.1 and ME.2) identified by Grehan et al. [5] control apoE expression in astrocytes, since in their absence, apoE is not expressed in these cells. A series of transcription factors and nuclear receptors regulate apoE, upon binding on its proximal promoter or on other regulatory elements [6]. Among the nuclear receptors, RXRα and LXRα were reported to modulate apoE gene expression [7].

The thyroid hormones can regulate gene expression through their interaction with the thyroid hormone receptor (TR). TR is a member of the nuclear receptors family with important role in modulating key functions, such as cell growth and differentiation [8], development, lipid and carbohydrate metabolism [9,10], and cardiovascular function [11]. In the brain, TRs are involved in

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; apoE, apolipoprotein E; LXR, Liver X Receptor; ME.2, Multienhancer 2; RA, 9-*cis*-Retinoic Acid; RXR, Retinoid X Receptor (RXR); T3, L-3,5,3′-triiodothyronine; Thyroid Hormone Receptor β, TRβ; TO, TO-901317.

* Corresponding author. Department of Genomics, Transcriptomics and Molecular Therapies, Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", 8 B.P. Hasdeu Street, Bucharest 050568, Romania.
E-mail address: anca.gafencu@icbp.ro (A.V. Gafencu).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.132
0006-291X/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

fundamental processes such as neural development, differentiation, synaptogenesis, myelination, signaling and cell migration [12]. Moreover, a connection between AD risk and TR gene polymorphisms has been reported [13]. After ligand binding, TRs regulate cell processes acting on gene expression, usually as heterodimers with RXR. Triiodothyronine (T3) shows a great affinity for the TR/RXR complex, while 9-*cis*-Retinoic Acid (RA) induces the release of co-repressors without conformational change of the complex formed by the two partners [14]. In addition, it was demonstrated that TRs cross-talk with other nuclear receptors such as PPAR [15], LXR [16], RAR [17], GR [18]. Several isoforms of TR were identified so far, among which TRα1, TRβ1 and TRβ2 contain DNA- and ligand (T3)- binding domains [19]. TRα1 and TRβ1 are nearly ubiquitously expressed, while TRβ2 is expressed in the developing brain, hypothalamus, and anterior pituitary gland, as reviewed in Ref. [9].

We hypothesize that thyroid hormones and their receptors have a role in apolipoprotein regulation in the brain. Herein we present data demonstrating that thyroid hormones upregulate apoE gene in astrocytes by a mechanism involving long range interactions between apoE promoter and ME.2, which binds ligand-activated TR. These data are particularly relevant for the prevention or future treatments of apoE-related neurodegenerative diseases.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

DMEM and fetal bovine serum (FBS) were from Invitrogen (Life Technologies), Luciferase Assay System was from Promega (Madison, WI). The primers were from Invitrogen (Life Technologies), except biotinylated RV3 primer and primers for TRβ, which were from Microsynth AG (Switzerland). Anti-TRβ monoclonal antibodies (J51, sc-737), anti-LXRα/β rabbit polyclonal antibodies (H-144, sc-13068) and anti-β-actin monoclonal antibodies (C4; sc-47778) were from Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA). Anti-human apoE (A299) rabbit antibodies were from Immuno-Biological Laboratories Co., LTD. (Aramachi, Takasaki-Shi, Gunma, Japan). T3, 9-cis-Retinoic Acid, and TO901317 were from Sigma. Streptavidin-Dynabeads M-280 were from Thermo Fisher Scientific. InnuPREP RNA Mini kit was from Analytik Jena (Jena, Germany), high-capacity cDNA Reverse Transcription kit was from Applied Biosystems, and SuperSignal West Pico substrate from Pierce Biotechnology, Rockford, USA. Charcoal-stripped serum was from SIGMA.

2.2. Plasmid construction

The TRβ expression vector was obtained by excising the cDNA encoding THRβ gene from the pCR-BluntI-TOPO vector (clone MHS4426-98361206 from Open Biosystem-Thermo Scientific) with HindIII and XbaI and ligating it into pCMV-SPORT6 expression vector. Human apoE promoter alone (−500apoE) or together with multienhancer 2 (ME.2/-500apoE) was cloned in pGL3 basic vector in front of luciferase reporter gene, as previously described [20]. ME.2 (19–619 ME.2) and its deletion mutants (341–619 ME.2, 509–619 ME.2, 19–488 ME.2, and 19–298 ME2) were amplified with the primers described in Ref. [20], except the primer F509: 5′-GGGGTACCCAGAGGGTGAATAAGAGCAG which was used as forward for the amplification of the fragment 509–619. The fragments were cloned in pGL3 vector containing a minimal promoter described in Ref. [21].

2.3. Cell culture and transfection

HTB14, HEK 293 and HepG2 cells (from ATCC) were grown in DMEM supplemented with 10% FBS. Cells were transiently transfected as described in Ref. [20], then FBS was replaced with charcoal stripped serum and the transfected cells were incubated for 24 h with ligands for TRβ, RXRα, LXRα (75 nM T3, 1 μM 9-*cis*-Retinoic Acid, and 10 μM TO901317, respectively). The activity of the luciferase reporter gene was determined with a FB12 Luminometer (Berthold), as previously described [22].

2.4. RT-PCR

Total RNA from HTB14 cells was extracted using InnuPREP RNA Mini kit. cDNA was obtained from 1 μg of RNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit. The primers used for apoE and GAPDH were described in Ref. [20]. For human TRβ, the primers were: 5′-TCCTTCTGGTTGGCTGTCCTGCGTG (forward) and 5′-TGGTCTGGATGAGATGTGGCGACG (reverse).

2.5. Western blot

Ligand-treated and control HTB14 cells were washed in PBS, solubilized, subjected to SDS-PAGE and then transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). After blocking, the membranes were incubated overnight (4 °C) with the primary antibodies (anti-apoE, TRβ and β-actin), followed by incubation with HRP-conjugated secondary antibodies. The bands were detected with SuperSignal West Pico substrate with LAS-4000 Chemiluminescent Image Reader (FUJIFILM Europe GmbH, Germany).

2.6. DNA pull-down assay (DNAP)

ME.2 (19–619) or its fragments (19–141, 19–488, 341–488, 267–619) were amplified by PCR using biotinylated RV3 forward primer, reverse primers and corresponding plasmids containing ME.2 fragments, as described in Ref. [20]. Whole cell extract from HEK 293 cells overexpressing TRβ and RXRα was obtained as previously described [22] and incubated with the biotinylated DNA immobilized on Streptavidin-Dynabeads for 16 h at 4 °C in binding buffer described in Ref. [20]. The complexes were washed 10 times with binding buffer (4 °C), and subjected to Western blot using anti-TRβ and anti-RXRα antibodies. The bands were detected as above.

2.7. Statistical analysis of the data

All experiments described above were run in triplicates and repeated at least three times. Fold-changes were calculated as ratios of the averages between treated and control samples. Statistical analysis was performed using one-way analysis variance between groups with OriginPro 7.5. All values were expressed as means ± S.E; $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. T3 and 9-cis-Retinoic Acid significantly enhance apoE expression in astrocytes

To test the capacity of T3 to modulate apoE gene expression in astrocytes, HTB14 cells were exposed to increasing concentrations of hormone (from 7.5 nM to 750 nM), in the presence of 1 μM RA. In addition, we tested apoE expression in astrocytes treated with 1 μM RA alone or in the presence of 10 μM TO, to compare the effect of TR/RXR heterodimers with the activity of RXR homodimers or LXR/

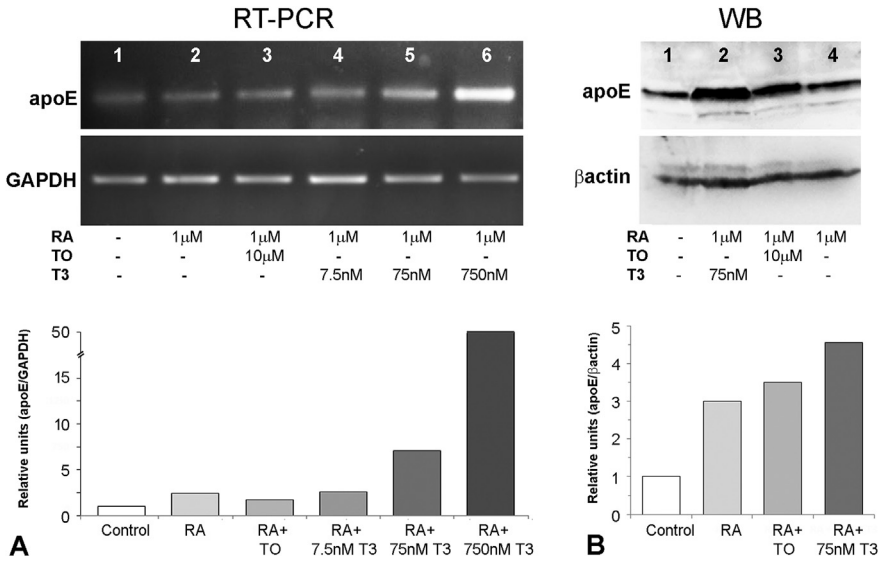


Fig. 1. In astrocytes, ligand-activated RXR and its heterodimerization partners, TR and LXR, modulate apoE expression at gene and protein level. (A) Astrocytes incubated with RA alone or in combination with 1 μM TO (LXR ligand) or 7.5 nM T3 exhibit a ~2.5 fold increase in apoE mRNA level; T3 modulates apoE gene expression in a dose-dependent manner in HTB14 cells, as detected by RT-PCR, up to a ~50 fold increase for 750 nM T3. **(B)** ApoE protein level increases more in cells treated with T3 in the presence of RA (4.5 times) than in cells exposed to RA alone or in combination with TO, as revealed by Western blot. GAPDH and β-actin were used as internal control for RT-PCR and Western blot, respectively. Representative experiments are illustrated.

RXR heterodimers. Total RNA from the treated cells was extracted and analyzed by RT-PCR. The results obtained showed that apoE expression in cells exposed to RA or with the combination of RA and TO increased ~2.4 fold compared with control cells (Fig. 1A, lanes 1–3). The combination between T3 and RA increased apoE gene expression in a dose-dependent manner. Thus, increasing T3 concentrations from 7.5 nM to 75 nM and further to 750 nM induced an increase in apoE expression by 2.5, 7 and 50 times, respectively (Fig. 1A, lanes 4–6).

ApoE protein expression in astrocytes was assessed by Western blot using cells treated with 75 nM T3 in the presence of 1 μM RA; in addition, the effect of cell treatment with 10 μM TO in the presence of RA, or only with RA for 24 h was also tested. β-actin expression was assessed for normalization. Data showed that apoE protein level increased ~4.5 times upon exposure to T3 and RA (Fig. 1B, lane 2) as compared with HTB14 control cells (Fig. 1B, lane 1). Cell treatment with the LXRα/RXRα ligands (TO and RA) augmented apoE expression in astrocytes, but the induction was smaller than that of TR ligands, namely 3.5 times for RA with TO and ~3 times for RA alone (Fig. 1, lanes 3, 4). Similar results were obtained for another human tumor brain cell line, HTB13 (data not shown).

Next, we determined TRβ expression in HTB14 cells and found that HTB14 cells express TRβ at both mRNA and protein levels (Fig. 2A and B).

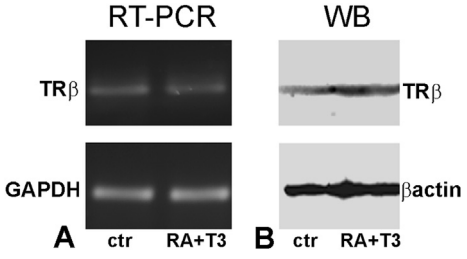


Fig. 2. HTB14 astrocytes express TRβ. TRβ expression in cultured HTB14 cells untreated or exposed to T3 and RA was assessed by RT-PCR (**A**) or Western Blot (**B**). TRβ is detected at mRNA and protein level in both untreated and treated astrocytes. GAPDH and β-actin were used as internal controls for RT-PCR and Western blot, respectively.

3.2. *In astrocytes, ligand-activated TRβ/RXRα heterodimer binds on ME.2 and induces apoE promoter activity via long range interactions*

We further tested whether TRβ/RXRα overexpression in the presence of T3 and RA modulates the activity of apoE proximal promoter directly or indirectly via multienhancer 2. Astrocytes were transiently co-transfected with plasmids containing apoE proximal promoter (−500apoE) or constructs containing ME.2 in front of apoE proximal promoter in pGL3 basic vector (ME.2/-500apoE), in the presence of expression vectors for RXRα alone or together with TRβ or LXRα. Eighteen hours after transfection, the corresponding ligands were added: RA for RXRα, T3 and RA for TRβ/RXRα, and T0 and RA for LXRα/RXRα. Overexpression of ligand-activated TRβ/RXRα heterodimers had no effect on apoE promoter (Fig. 3A, RA + T3 column), but produced a significant upregulatory effect on apoE promoter linked to ME.2 (Fig. 3B, column RA + T3). Overexpression of RXRα alone or with LXRα in the presence of the corresponding ligands raised ~9 times apoE promoter activity only in the presence of ME2, but not in the absence of ME.2 (Fig. 3B and A, respectively). The same effects were detected in HTB11 neuroblastoma cells (not shown). By contrast, similar experiments in HepG2 revealed no activation by T3 on apoE promoter in the presence or absence of ME.2 (Fig. 3C and D). These data revealed that T3 modulation on apoE promoter is cell-type specific, due to the selective action of ME.2.

3.3. *TRβ/RXRα binding site is located on ME.2*

To identify the location of TRβ/RXRα binding site on ME.2 fragment, we analyzed the binding of TRβ and RXRα on full-length ME.2 or its deletion fragments 19–141, 19–488, 341–488, 267–619. For this, we performed DNAP experiments using biotinylated full-length or ME.2 fragments and whole cell extracts obtained from HEK 293 cells overexpressing TRβ and RXRα. The TRβ and RXRα bound to 5′-biotinylated ME.2 were precipitated with Streptavidin-

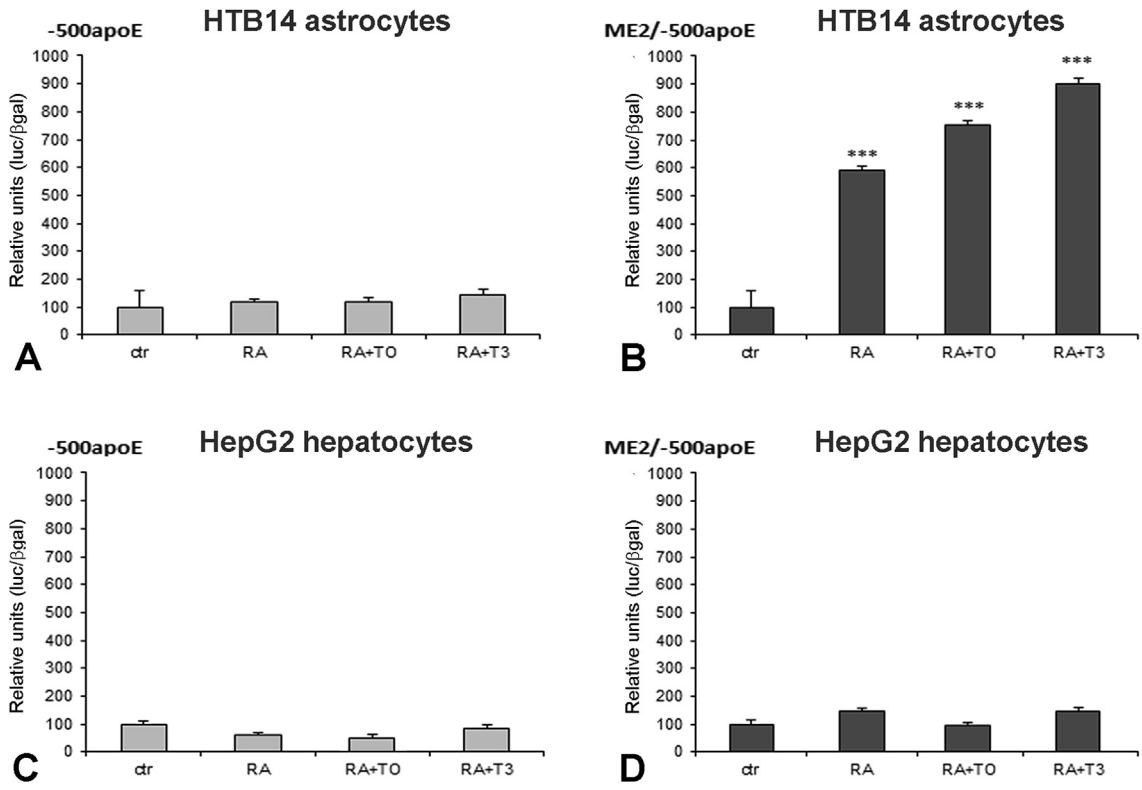


Fig. 3. Ligand-activated TRβ/RXRα heterodimers act on the distal regulatory element ME.2 and transactivate apoE promoter in astrocytes. Transient transfections were performed using plasmids containing apoE promoter cloned in pGL3 vector (−500apoE, **A, C**) and plasmids containing ME.2 in front of apoE promoter (ME.2/-500apoE, **B, D**). The cells were co-transfected with expression vectors for RXRα, TRβ/RXRα and LXRα/RXRα and treated with the corresponding ligands (RA, RA + T3 and RA + TO, respectively). In the absence of ME2, apoE promoter activity is not modulated by the nuclear receptors tested either in astrocytes or in hepatocytes (**A, C**, respectively). In the presence of ME.2, in astrocytes (**B**) but not in hepatocytes (**D**) apoE promoter activity is significantly increased ($p < 0.001$) by RXRα, LXRα/RXRα and TRβ/RXRα, the latter exhibiting the highest activity.

Dynabeads and identified by Western blot. Ligand-activated TRβ and RXRα bound to ME.2 and to 19–488, 341–488, 267–619 fragments of ME.2, but not to 19–141 fragment (Fig. 4A, right). As positive control, whole cell extracts prepared from TRβ- and RXRα-overexpressing HEK 293 cells were used (Fig. 4A, right, lane NE). No binding was detected for random DNA (Fig. 4A, lane Rnd). These results indicated that a TRβ/RXRα binding site is located in the 341–488 region of ME.2, as schematically illustrated in Fig. 4A, left.

To confirm the presence of TRβ/RXRα binding site on ME.2, series of 5′ and 3′ deletion mutants of ME.2 placed in front of a minimal promoter were tested for their capacity to be activated by RA and T3 treatment in cells overexpressing TRβ and RXRα. The results showed that the activities of 5′-deletion mutant 341-619ME.2 and 3′-deletion mutant 19-488ME.2 are increased by TRβ/RXRα (Fig. 4B). By contrast, shorter mutants such as 509-619ME.2 and 19-298ME.2 are not activated by TRβ/RXRα (Fig. 4B). These data corroborate with DNAP results and confirm the localization of TRβ/RXRα binding site within the region 341–488 of ME.2.

4. Discussion

In the brain, astrocytes represent the main apoE supplier, since through the brain–blood barrier only a small fraction of high density lipoproteins are transported from the blood [23]. Consequently, apoE biosynthesis and secretion by astrocytes are vital to warrant the proper apoE level in the brain. The regulatory mechanisms of apoE biosynthesis in the brain are not entirely elucidated, but data indicate that the hormonal control has a significant role. Among the hormones, estrogens were shown to increase apoE expression in mouse brain [24,25]. Since astrocytes play an essential role in the metabolism of thyroid hormones in the brain, being involved in thyroxine transport from the blood and its conversion to the active form 3,5,3′-triiodothyronine (T3), these cells are considered the main source of T3 for the central nervous system [26]. Thus, we focused on T3 role in apoE gene regulation in astrocytes. We show here that treatment with T3 in the presence of RA induces in astrocytes an increase in apoE expression in a dose-dependent manner (Fig. 1). Similar results were obtained on HTB13 astrocytoma cell line (data not shown). Since RXRα can homodimerize or heterodimerize with LXRα, we treated HTB14 cells with RA alone, or in combination with LXRα ligand, TO and followed-up apoE expression. In the astrocytes treated with TO and RA, apoE expression was positively modulated, but to a lower extent than that obtained with T3 and RA. Our data revealed that this positive regulation of apoE expression at mRNA level is also found at the protein level.

Herein we report for the first time the influence of thyroid hormones on apoE expression. Data from the literature refers to the upregulatory effect of the thyroid hormones on various other apolipoproteins such as apolipoprotein CII [27], apolipoprotein M [28] and apolipoprotein A5 [29]. Moreover, a decreased level of apolipoprotein B was reported after administration in patients of a thyromimetic compound (eprotirome) [30]. The modulatory action of T3 on apolipoprotein expression has consequences in lipid metabolism, and thus the thyroid hormones became a therapeutic target for hyperlipidemia. Due to the involvement of thyroid hormones in various processes, thyromimetic compounds that act in a tissue-specific manner were developed. For example, eprotirome [30] and indane derivatives [31] are potent liver-specific thyromimetics, lowering plasma cholesterol and avoiding heart toxicity and

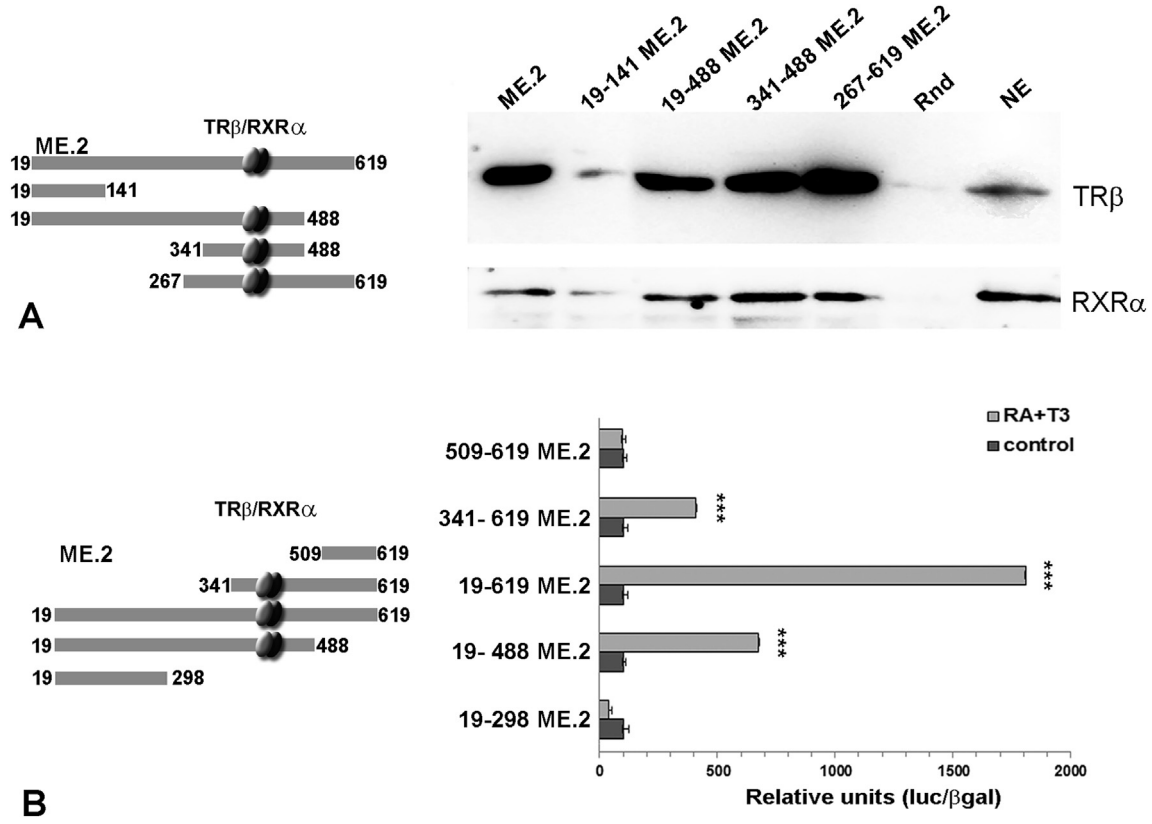


Fig. 4. Localization of TRβ/RXRα binding site on ME.2. (A) *In vitro* TRβ and RXRα binding to the full-length and some ME.2 fragments was determined by DNA pull down assay. Briefly, biotinylated DNA incubated with nuclear extract from cells transfected to overexpress TRβ and RXRα was precipitated with Streptavidin-Dynabeads; bound TRβ and RXRα were identified by Western Blot. TRβ and RXRα bind to the entire ME.2 (19–619) and its fragments 19–488, 341–488, 267–619, but not to the 19–141 fragment, depending on the presence or absence of the binding site (schematically illustrated on the left side). No band is present in the negative control (random DNA, Rnd); the positive control is represented by Western blot of the nuclear extract of the TRβ and RXRα transfected cells (NE). **(B)** Ligand-activated TRβ/RXRα heterodimers transactivate ME.2 or its deletion mutants containing TRβ/RXRα binding site. Transient transfections were performed using ME.2 deletion mutants cloned in front of a minimal promoter in pGL3 basic vector. The activity of luciferase reporter gene was enhanced by the ligand-activated TRβ/RXRα when ME.2 fragments contain the putative TRβ/RXRα binding site (341–619, 19–488); mutants 509–619 and 19–298, from which the TRβ/RXRα was deleted, could not be stimulated by TRβ/RXR overexpression.

other side effects. Our data showed that TRβ are expressed in HTB14, data in agreement with the reported TRβ2 expression in astrocytes [32].

In the brain, macrophages, and adipose cells, apoE expression is controlled by two distal multienhancers, ME.1 and ME.2, localized 3.3 kb and respectively 15 kb downstream of apoE gene, which evolved through gene duplication [5,33]. Despite their 95% homology, ME.2 seems to be more active in apoE induction in the brains of transgenic mice [5], and thus we focused on ME.2 in the current work. Our results showing enhanced apoE expression by the ligands of RXRα or LXRα/RXRα in astrocytes are similar with the data obtained on macrophages [34].

To investigate the mechanisms underlying TRβ action on apoE gene regulation, first we tested the ability of the ligand-activated TRβ/RXRα to activate apoE promoter alone or in the presence of ME.2. Our transient transfection experiments in astrocytes using plasmids containing apoE proximal promoter revealed that only in the presence of ME.2, apoE promoter is transactivated by RXRα/RXRα, TRβ/RXRα and LXRα/RXRα. In HepG2 cells, where ME.2 is not active, RXRα overexpression alone or in the presence of TRβ or LXRα did not enhance apoE promoter activity regardless ME.2 presence (Fig. 3C and D). Thus, we focused on ME.2 in the search for a TRβ binding site. Using TFBIND Search software [35] we identified a putative TRβ binding site starting at 409 in ME.2, which might play a role in the regulation of apoE gene expression. Thereafter we used two alternative techniques to assess the biological activity of TRβ binding site. First, we tested the binding *in vitro* by DNAP, in which the TRβ/RXRα bound to ME.2 or its deletion fragments were identified by Western Blot.

Then, we questioned if the activated complex TRβ/RXRα overexpressed in HTB14 cells is able to increase the activity of ME.2 deletion mutants and found that TRβ/RXRα binding site on ME.2 identified by *in silico* analysis is biologically active. Interestingly, this region is overlapping with a sequence that was previously identified as a LXR binding site [7]. This may be explained by the similitude of the binding sites of these two nuclear receptors. Moreover, a competition for the promoter activation between TRβ and LXRα, up-regulating the important Seladin-1 gene involved in AD, was reported [36].

In conclusion, our results show that in astrocytes (i) ligand activation of TRβ/RXRα complex is implicated in apoE gene regulation; (ii) the interaction between hormone-responsive TRβ and RXRα, which bind to ME.2 and not to apoE promoter; (iii) the binding site of TRβ/RXRα heterodimer is located at 409 bp in ME.2. Taken together, our data indicates that the regulation of apoE by thyroid hormones is cell-specific and is done via long range interactions in astrocytes. The new findings regarding the T3 signaling pathway in the brain emphasize the role of thyroid hormone on apoE gene regulation, and may contribute to the development of novel therapies for the treatment of apoE-related neurodegenerative diseases.

Acknowledgments

This work was supported by grants of the Romanian National Authority for Scientific Research and Innovation, CNCS-UEFISCDI, project PN-II-ID-PCE-2011-3-0591 (contract 197/2011, granted to AG), PN-II-RU-TE-2014-4-2660 (contract 84/2015, granted to VT) and by the Romanian Academy. Corina Roman and Violeta Trusca acknowledge the support of the strategic grant POSDRU/159/1.5/S/133391, financed by the European Social Fund within the Sectorial Operational Program Human Resources Development 2007–2013. The authors thank Dr. Ovidiu Croitoru for graphic design.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.132.

References

[1] V.V. Giau, E. Bagyinszky, S.S. An, et al., Role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases, Neuropsychiatr. Dis. Treat. 11 (2015) 1723–1737.
[2] R.E. Pitas, J.K. Boyles, S.H. Lee, et al., Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins, Biochim. Biophys. Acta 917 (1987) 148–161.
[3] J.K. Boyles, R.E. Pitas, E. Wilson, et al., Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system, J. Clin. Investig. 76 (1985) 1501–1513.
[4] O. Myklebost, S. Rogne, A physical map of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 19, Hum. Genet. 78 (1988) 244–247.
[5] S. Grehan, E. Tse, J.M. Taylor, Two distal downstream enhancers direct expression of the human apolipoprotein E gene to astrocytes in the brain, J. Neurosci. 21 (2001) 812–822.
[6] D. Kardassis, A. Gafencu, V.I. Zannis, et al., Regulation of HDL genes: transcriptional, posttranscriptional, and posttranslational, Handb. Exp. Pharmacol. 224 (2015) 113–179.
[7] B.A. Laffitte, J.J. Repa, S.B. Joseph, et al., LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98 (2001) 507–512.
[8] A. Pascual, A. Aranda, Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation, Biochim. Biophys. Acta 1830 (2013) 3908–3916.
[9] C. Pramfalk, M. Pedrelli, P. Parini, Role of thyroid receptor beta in lipid metabolism, Biochim. Biophys. Acta 1812 (2011) 929–937.
[10] R. Mullur, Y.Y. Liu, G.A. Brent, Thyroid hormone regulation of metabolism, Physiol. Rev. 94 (2014) 355–382.
[11] H. Vargas-Uricoechea, C.H. Sierra-Torres, Thyroid hormones and the heart, Horm. Mol. Biol. Clin. Investig. 18 (2014) 15–26.
[12] J. Bernal, Thyroid hormone receptors in brain development and function, Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. 3 (2007) 249–259.
[13] L. Goumidi, F. Flamant, C. Lendon, et al., Study of thyroid hormone receptor alpha gene polymorphisms on Alzheimer's disease, Neurobiol. Aging 32 (2011) 624–630.
[14] J. Fattori, J.L. Campos, T.R. Doratioto, et al., RXR agonist modulates TR: corepressor dissociation upon 9-cis retinoic acid treatment, Mol. Endocrinol. 29 (2015) 258–273.
[15] Y.Y. Liu, R.S. Heymann, F. Moatamed, et al., A mutant thyroid hormone receptor alpha antagonizes peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in vivo and impairs fatty acid oxidation, Endocrinology 148 (2007) 1206–1217.
[16] K. Hashimoto, M. Mori, Crosstalk of thyroid hormone receptor and liver X receptor in lipid metabolism and beyond [Review], Endocr. J. 58 (2011) 921–930.
[17] F. Flamant, J. Samarut, Involvement of thyroid hormone and its alpha receptor in avian neurulation, Dev. Biol. 197 (1998) 1–11.
[18] P. Gil-Ibanez, J. Bernal, B. Morte, Thyroid hormone regulation of gene expression in primary cerebrocortical cells: role of thyroid hormone receptor subtypes and interactions with retinoic acid and glucocorticoids, PLoS One 9 (2014) e91692.
[19] F. Flamant, K. Gauthier, Thyroid hormone receptors: the challenge of elucidating isotype-specific functions and cell-specific response, Biochim. Biophys. Acta 1830 (2013) 3900–3907.
[20] V.G. Trusca, E.V. Fuior, I.C. Florea, et al., Macrophage-specific up-regulation of apolipoprotein E gene expression by STAT1 is achieved via long range genomic interactions, J. Biol. Chem. 286 (2011) 13891–13904.
[21] S. Dennler, S. Itoh, D. Vivien, et al., Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene, EMBO J. 17 (1998) 3091–3100.
[22] A.V. Gafencu, M.R. Robciuc, E. Fuior, et al., Inflammatory signaling pathways regulating ApoE gene expression in macrophages, J. Biol. Chem. 282 (2007) 21776–21785.
[23] H. Wang, R.H. Eckel, What are lipoproteins doing in the brain? Trends Endocrinol. Metab. 25 (2014) 8–14.
[24] R.A. Srivastava, N. Bhasin, N. Srivastava, Apolipoprotein E gene expression in various tissues of mouse and regulation by estrogen, Biochem. Mol. Biol. Int. 38 (1996) 91–101.
[25] D.J. Stone, I. Rozovsky, T.E. Morgan, et al., Astrocytes and microglia respond to estrogen with increased apoE mRNA in vivo and in vitro, Exp. Neurol. 143 (1997) 313–318.
[26] R.S. Dezonne, F.R. Lima, A.G. Trentin, et al., Thyroid hormone and astroglia: endocrine control of the neural environment, J. Neuroendocrinol. 27 (2015) 435–445.
[27] D. Kardassis, E. Sacharidou, V.I. Zannis, Transactivation of the human apolipoprotein CII promoter by orphan and ligand-dependent nuclear receptors. The regulatory element CIIC is a thyroid hormone response element, J. Biol. Chem. 273 (1998) 17810–17816.
[28] I. Mosialou, V.I. Zannis, D. Kardassis, Regulation of human apolipoprotein m gene expression by orphan and ligand-dependent nuclear receptors, J. Biol. Chem. 285 (2010) 30719–30730.
[29] X. Prieur, T. Huby, H. Coste, et al., Thyroid hormone regulates the hypotriglyceridemic gene APOA5, J. Biol. Chem. 280 (2005) 27533–27543.
[30] P.W. Ladenson, J.D. Kristensen, E.C. Ridgway, et al., Use of the thyroid hormone analogue eprotirome in statin-treated dyslipidemia, N. Engl. J. Med. 362 (2010) 906–916.
[31] H. Shiohara, T. Nakamura, N. Kikuchi, et al., Discovery of novel indane derivatives as liver-selective thyroid hormone receptor beta (TRbeta) agonists for the treatment of dyslipidemia, Bioorg. Med. Chem. 20 (2012) 3622–3634.
[32] J.L. Leonard, A.P. Farwell, P.M. Yen, et al., Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms in neurons and astroglial cells, Endocrinology 135 (1994) 548–555.
[33] S.J. Shih, C. Allan, S. Grehan, et al., Duplicated downstream enhancers control expression of the human apolipoprotein E gene in macrophages and adipose tissue, J. Biol. Chem. 275 (2000) 31567–31572.
[34] P.A. Mak, B.A. Laffitte, C. Desrumaux, et al., Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta, J. Biol. Chem. 277 (2002) 31900–31908.
[35] T. Tsunoda, T. Takagi, Estimating transcription factor bindability on DNA, Bioinformatics 15 (1999) 622–630.
[36] E. Ishida, K. Hashimoto, S. Okada, et al., Thyroid hormone receptor and liver X receptor competitively up-regulate human selective Alzheimer's disease indicator-1 gene expression at the transcriptional levels, Biochem. Biophys. Res. Commun. 432 (2013) 513–518.

Biochemical and Biophysical Research Communications 468 (2015) 66–72

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Krüppel-like factor 4 synergizes with CREB to increase the activity of apolipoprotein E gene promoter in macrophages

Simona Stavri [a], Maya Simionescu [a], Dimitris Kardassis [b], Anca V. Gafencu [a, *]

[a] Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", Bucharest, Romania
[b] University of Crete Medical School and Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology of Hellas, Heraklion, Crete, Greece

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 October 2015
Accepted 30 October 2015
Available online 4 November 2015

Keywords:
Apolipoprotein E
CREB
KLF4
Gene regulation
Monocyte differentiation
Macrophage

ABSTRACT

Krüppel-like factor 4 (KLF4) is a critical regulator of monocyte differentiation and macrophage polarization, and it also plays an important role in several vascular diseases, including atherosclerosis. Apolipoprotein E (apoE) is an essential anti-atherosclerotic glycoprotein involved in lipid metabolism, expressed by the liver, macrophages and other cell types. We hypothesized that KLF4 is involved in apoE gene regulation in macrophages. Our experiments showed that differentiation of THP-1 monocytes to macrophages using PMA was associated with a robust induction of both KLF4 and apoE genes. KLF4 bound to the apoE promoter, as revealed by chromatin immunoprecipitation and DNA pull-down (DNAP) assays, and transactivated the apoE promoter in a dose-dependent manner. Using a series of apoE promoter deletion mutants we revealed the biological activity of multiple KLF4 binding sites located in the [−500/−100] region of apoE promoter. Moreover, overexpression of cAMP-response-element-binding protein (CREB) further increased KLF4 up-regulatory effect on apoE promoter. Despite the fact that no putative CREB binding sites were predicted *in silico*, we found that in macrophages CREB bound to apoE proximal promoter in the region −200/+4 and even more strongly on −350/-274 region. In similar DNAP experiments using cell extracts obtained from monocytes (lacking KLF4), a very weak binding of CREB was detected, indicating that interaction of CREB with apoE promoter takes place indirectly. In conclusion our results show: (*i*) a robust synchronized induction of KLF4 and apoE expression during differentiation of monocytes to macrophages; (*ii*) KLF4 up-regulates apoE gene in a dose-dependent manner; (*iii*) biologically active KLF4 binding sites are present on apoE promoter and (*iv*) the interaction of KLF4 with CREB results in an enhanced up-regulatory effect of KLF4 on apoE promoter. Taken together these data provide novel knowledge on apoE gene regulation mechanism in macrophages, and offer insight into the therapeutic potential of KLF4 in atherosclerosis.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

KLF4, Krüppel-like factor 4, also named gut-enriched Krüppel-like factor or epithelial zinc finger transcription factor [1,2] is a zinc finger-containing transcription factor that modulates gene expression by binding to GC-rich sites or CACCC sequences [3,4]. KLF4 was first identified in the gut and skin epithelia [1,5], but is also expressed by different cell types involved in the development of vascular disease, such as monocyte-derived macrophages, endothelial and vascular smooth muscle cells [6–8]. Moreover, it was shown that KLF4 regulates vascular inflammation by controlling macrophage polarization [7] and monocyte differentiation [6,9]. It was reported that KLF4 deficiency led to enhanced atherosclerotic lesion formation and macrophage accumulation in the plaque [10]. However, the role of KLF4 in atherosclerosis has not been fully determined yet.

CREB, cAMP-response-element-binding protein, a ubiquitously expressed transcription factor was reported to be involved in a series of processes relevant to cardiovascular physio-pathology

Abbreviations: apoE, apolipoprotein E; CREB, cAMP-response-element-binding protein; ChIP, chromatin immunoprecipitation; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; KLF4, Krüppel-like factor 4; DNAP, DNA pull-down assay; luc, luciferase; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate.

* Corresponding author. Department of Genomics, Transcriptomics and Molecular Therapies, Institute of Cellular Biology and Pathology, "Nicolae Simionescu", 8, B.P. Hasdeu Street, Bucharest, 050568, Romania.
E-mail address: anca.gafencu@icbp.ro (A.V. Gafencu).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.163
0006-291X/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

[11]. Moreover, CREB is essential for the survival of monocytes and macrophages, playing anti-inflammatory roles [12].

Apolipoprotein E (apoE) is a glycoprotein of 34 kDa mostly synthesized by the liver [13]. As a part of very low density lipoproteins, chylomicrons and large high density lipoproteins, apoE plays an important role in lipid metabolism [14,15]. ApoE deficiency, due to impeded clearance of atherogenic lipoproteins from the plasma, causes hyperlipidemia and the ensuing development of atherosclerotic lesions [16,17].

Based on the pivotal role of KLF4 in macrophage biology and various processes involved in atherosclerosis, we hypothesized that KLF4 plays a role in apoE gene induction during monocyte differentiation towards macrophages. We present here data that show a robust simultaneous induction of KLF4 and apoE expression during differentiation of monocyte-derived macrophages, the existence of KLF4 binding sites on apoE promoter and the molecular partnership of KLF4-CREB that results in enhanced apoE gene induction. These results aid to the elucidation of the regulatory mechanism of KLF4 on apoE expression, and indicate KLF4 as a potential new target in the therapy of atherosclerosis.

2. Materials and methods

2.1. Materials

DMEM, RPMI-1640, Streptavidin-Dynabeads M−280 and protein A Sepharose beads were from Thermo-Scientific. Fetal bovine serum (FBS) was from EuroClone (Italy). Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), GoTaq DNA polymerase, proteinase K and Luciferase assay system were from Promega (USA). Chemiluminescence kit was from Pierce (Rockford, USA). Protease Inhibitors cocktail was from Roche. Rabbit anti-KLF4 polyclonal antibody (11880-1-AP) was from Proteintech Group. Mouse anti-β-actin antibody (sc-47778) and rabbit anti-CREB1 antibody (C-21; sc-186) were from Santa Cruz Biotechnology (USA). Anti-human apoE antibody was from Immuno-Biological Laboratories Co., LTD. (Japan). Secondary antibodies labeled with HRP were from Rockland. All other chemicals were from Sigma−Aldrich.

2.2. Cell culture

Human THP-1 monocytes (from ATCC) were grown in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated FBS. To obtain monocyte-derived macrophages, THP-1 monocytes were treated with 50 nM PMA for 16 h as previously described in Ref. [18]. HepG2 and HEK-293 cells (from ATTC) were grown in DMEM with 10% FBS, at 37 °C, in a 5% CO_2 incubator.

2.3. Western blot

Cell lysates from monocytes and macrophages were subjected to SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane (Bio-Rad). The blots were incubated with anti-KLF4, anti-apoE and anti-β-actin, followed by HRP-labeled appropriate secondary antibodies. The proteins were revealed as previously described [19].

2.4. Plasmid construction

Plasmids containing apoE proximal promoter ([−500/+73] apoE-luc) or its deletion mutants [-400/+73]apoE-luc, [−300/+73] apoE-luc, [−200/+73]apoE-luc, [−100/+73]apoE-luc, [−55/+73] apoE-luc) were obtained by cloning the respective inserts in front of the luciferase reporter gene in pGL3 basic vector (Promega). Plasmids [−500/+73] apoE-luc, [−100/+73]apoE-luc, [−55/+73]apoE-luc were described in Ref. [20]. The rest of the mutants were constructed similarly, using primer R+73 [20] and the forward primers described in Table 1.

2.5. Transient transfections

HEK-293 or HepG2 cells were transiently transfected as described in Ref. [20] using the plasmids described above and the expression vectors for KLF4 (Clone ID: 5111134 from Open Biosystem, ThermoScientific) and for CREB, described in Ref. [18]. The luciferase activity was detected and normalized to β-galactosidase activity, as previously described [20]. Each experiment was done in triplicate and repeated at least three times.

2.6. Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Monocyte-derived macrophages were subjected to ChIP assay. Briefly, the cells were fixed in 1% paraformaldehyde (10 min) and then the chromatin samples were prepared by sonication, precleared with protein A Sepharose beads and immunoprecipitated using anti-KLF4 antibody for 18 h at 4 °C. From each chromatin sample, 10% was stored as “input”. The DNA-protein complexes were incubated for 4 h at 65 °C, and then digested with proteinase K to reverse the DNA-protein cross-linking. DNA was purified using phenol/chloroform and analyzed by PCR, using primers for apoE promoter: forward primer (F-254) 5′-GGGGTACCTCCACGCTT GGCCCCC and reverse primer R+4, described in Table 2.

2.7. DNA pull-down assay

This assay was performed as previously described [19]. Briefly, DNA for apoE promoter or its deletion fragments was amplified by PCR, using 5'-biotinylated RV3 forward primer (5′-CTAGCAAAA-TAGGCTGTCCC, Promega) and the reverse primers and the templates described in Table 2. Biotinylated DNA was coupled to Streptavidin-Dynabeads M−280 and incubated with whole cell extracts obtained from PMA-differentiated macrophages as we described earlier [19]. The complexes formed were washed and subjected to Western blot, using anti-KLF4 antibody diluted 1/1000 or anti-CREB1 antibody used as described in Ref. [21].

2.8. Statistical analysis

The results were statistically analyzed using One-way ANOVA. All data were expressed as means ± standard deviations. The p-values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Synchronized induction of KLF4 and apoE gene expression during differentiation of monocytes to macrophages

First we investigated the protein expression of KLF4 and apoE in monocytes and macrophages by Western blot. Interestingly, we detected a robust expression of both KLF4 and apoE (Fig. 1A, panels KLF4 and apoE) in PMA-differentiated macrophages (Fig. 1A, lane

Table 1
Primers used for cloning deletion mutants of apoE promoter.

Primer name	ApoE promoter fragment	Primer sequence
F-400	−400/+73	5′-GGGGTACCTGTCCAGCCCCCTAGCC
F-350	−350/+73	5′-GGGGTACCATCCCCAGCCCCCTCTCC
F-300	−300/+73	5′-GGGGTACCGGGTCAGGAAAGGAGGACTC
F-200	−200/+73	5′-GGGGTACCCCTGGGGACTGTGGGGG

Table 2
Primers and templates used in DNAP experiments.

ApoE promoter fragment	Reverse primer	Sequence of reverse primer	Template plasmid
−500/+4	R+4	5′ -GGGAGCTCGTGGGGCTGAGTAGGAC	[−500/+73]apoE
−500/−330	R-330	5′ -CTGGAGAGGGGGCTGGGGAT	[−500/+73]apoE
−350/−274	R-274	5′ -CCCAGAGTCCTCCTTTCCC	[−350/+73]apoE
−300/−170	R-170	5′ -ACCACCCCCCACAGTCCCC	[−300/+73]apoE
−200/+4	R+4	5′ -GGGAGCTCGTGGGGCTGAGTAGGAC	[−200/+73]apoE

PMA), whereas their expression in THP-1 monocytes was absent or below the limits of detection (Fig. 1A, lane Ctr). The level of β-actin was tested as endogenous control (Fig. 1A, panel β-actin). These results indicated a similarity in the expression pattern of KLF4 and apoE, namely they are expressed only in macrophages, but not in monocytes.

3.2. KLF4 binds to apoE promoter and regulates apoE gene expression

Next, we questioned whether the enhanced KLF4 expression (detected in macrophages) has an effect on apoE promoter activity. To this purpose, we employed HEK-293 cells which do not express KLF4 (data not shown) and induced by transfection different KLF4 levels in these cells. Briefly, the cells were seeded in 12-well plates and were transiently transfected with plasmids containing apoE promoter ([−500/+73]apoE-luc) in the presence of different amounts of KLF4 expression vector (0–2 μg plasmid/triplicate wells). The results shown in Fig. 1B revealed a dose-dependent increase in apoE promoter activity ~3.7-fold for 0.2 μg KLF4 ($p < 0.05$), ~6-fold for 1 μg KLF4 ($p < 0.01$) and ~11-fold for 2 μg KLF4 ($p < 0.001$).

The interaction between KLF4 and the apoE promoter in macrophages was verified also by ChIP assay. Thus, chromatin precipitated with anti-KLF4 antibodies showed a band of 258 bp for apoE promoter (Fig. 1C, lane KLF4), while for the negative control, where anti-KLF4 antibodies were omitted, the non-specific precipitated DNA was almost undetectable (Fig. 1C, lane NoAb). PCR using primers for apoE promoter and the input as template revealed the expected band of 258 bp (Fig. 1C, lane Input). These results clearly indicated that the binding of KLF4 to apoE proximal promoter in macrophages is specific.

In silico analysis, using TRANSFAC databases [22], predicted six binding sites for KLF4 transcription factor on apoE promoter, localized at positions −409, −381, −316, −259, −225 and −155, respectively, in the apoE gene promoter (Fig. 2A). To further explore the role of KLF4 on apoE gene modulation, and to confirm that KLF4 binds to apoE promoter, we performed DNA pull-down (DNAP) assay using whole cell extract obtained from PMA-differentiated macrophages. The results showed that KLF4 bound to the full-length apoE promoter sequence (Fig. 2B, lane [−500/+4]). Next we examined the functionality of the KLF4 binding sites predicted on apoE promoter, performing DNAP assay using biotinylated DNA for [−500/−330], [−350/−274], [−300/−170], [−200/+4]

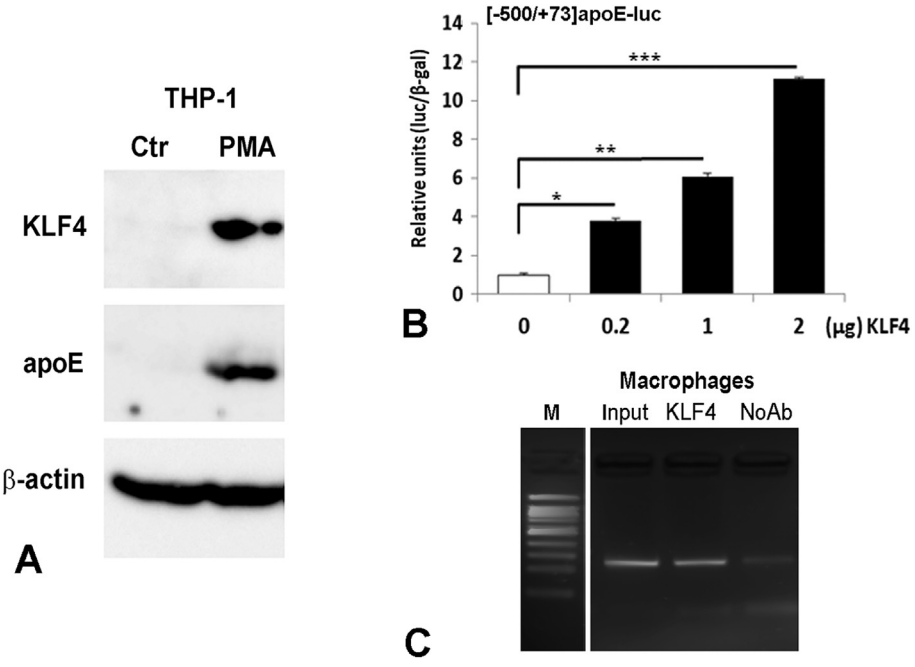


Fig. 1. KLF4 expression and involvement in apoE gene modulation in monocytes/macrophages. *Panel A*. KLF4 and apoE protein expressions were evaluated by Western blot using THP-1 monocytes or PMA-differentiated THP-1 macrophages. Note that KLF4 and apoE are absent in monocytes (lanes Ctr), but are robustly expressed in THP-1 macrophages (lanes PMA). As control for protein loading, β-actin was probed. *Panel B*. HEK-293 cells were transiently transfected with plasmids containing apoE promoter ([−500/+4]apoE-luc) in the presence of different amounts of KLF4 expression vector. The data show a dose-dependent increase in apoE promoter activity (* for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$, and *** for $p < 0.001$). *Panel C*. ChIP experiments performed on macrophages using anti-KLF4 antibodies. Note that upon the interaction between KLF4 and apoE promoter (lane KLF4) a band of 258 bp is detected. The negative control (similar experiments except that anti-KLF4 was omitted, lane NoAb) and the input (lane Input) are also shown.

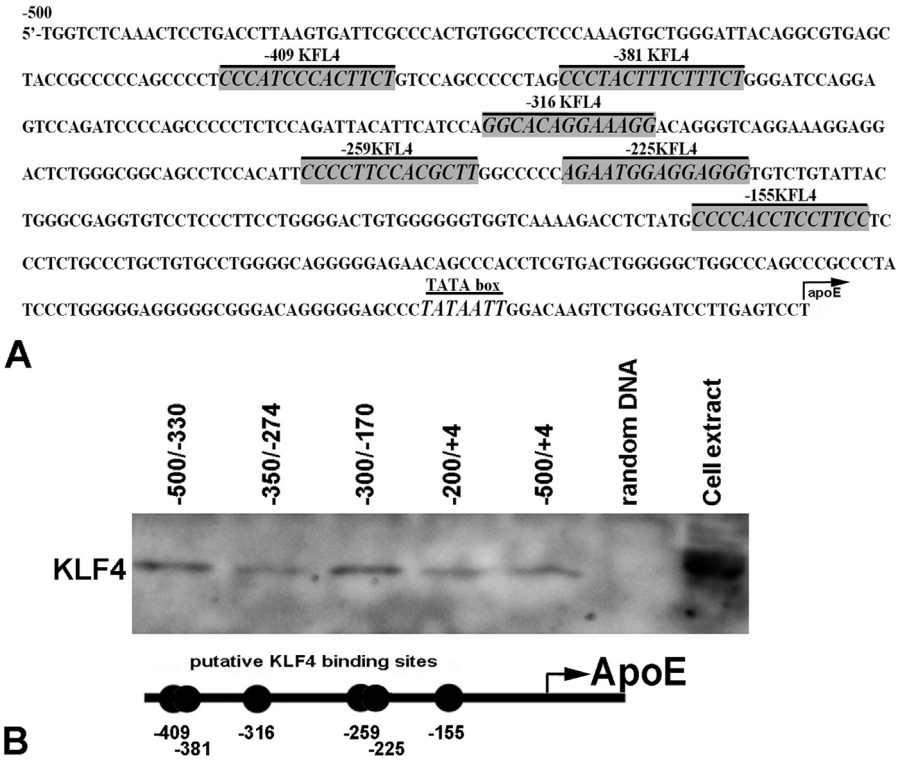


Fig. 2. KLF4 interacts with apoE promoter. *Panel A*. The putative binding sites of KLF4 located on apoE promoter sequence as determined by TRANSFAC analysis. *Panel B*. DNA pull-down assays were performed using biotinylated DNA for proximal apoE promoter or its fragments and cell extracts obtained from THP-1 differentiated macrophages. Note that KLF4 binds to multiple active binding sites of apoE promoter, as schematically illustrated above. No bands are detected in negative controls experiments in which random DNA sequence was used (lane random DNA). KLF4 expression (Western blot) in the cells used in the experiment is shown (lane cell extract).

fragments of apoE promoter. The results showed that all apoE promoter fragments bound KLF4 (Fig. 2B, lanes −500/−330, −350/-274, −300/−170 and −200/+4, respectively). No band was detected when DNAP assay was performed with a random DNA sequence (Fig. 2B, lane Random DNA). These results corroborate with the above ChIP data and provide additional evidence for the specific binding of KLF4 to apoE promoter sequence.

3.3. KLF4 enhances the activity of apoE promoter

To test whether KLF4 binding sites on apoE promoter are functionally active, HepG2 cells were transiently transfected with plasmids containing full-length apoE promoter ([−500/+73]apoE-luc) or its deletion mutants ([-400/+73]apoE-luc, [−300/+73]apoE-luc, [−200/+73]apoE-luc, [−100/+73]apoE-luc, [−55/+73]apoE-luc) in the presence or in the absence (control) of KLF4 expression vector. We found that KLF4 overexpression increased the activity of apoE promoter and its deletion mutants, as follows: ~11-fold for full-length promoter [−500/+73], ~11-fold for [−400/+73], ~6-fold for [−300/+73] and ~4-fold for [−200/+73], all with $p < 0.001$ (Fig. 3, columns −500apoE, −400apoE, −300apoE and −200apoE, respectively). By contrast, KLF4 overexpression did not enhance the activity of [−100/+73] and [−55/+73] apoE promoter fragments (Fig. 3, columns −100apoE and −55apoE). These results indicated that KLF4 binding sites located in the [−500/−100] region of apoE promoter are functional and play an important role in the up-regulation of apoE gene expression.

Taken together, the results of DNAP, ChIP and transient transfection experiments demonstrated the presence of functionally active KLF4 binding sites in the [−500/−100] region of apoE promoter which have an up-regulatory effect on apoE gene expression.

3.4. The up-regulatory effect of KLF4 on apoE promoter activity is enhanced by CREB

To modulate gene expression, KLF4 may interact with other transcription factors. CREB regulates a variety of immune cell processes including differentiation [12]. To examine the possibility that KLF4 and CREB act coordinately to induce apoE promoter activity, HepG2 cells were transiently transfected with plasmids containing apoE promoter ([−500/+73]apoE-luc) alone (control) or in the presence of expression vectors for KLF4 and/or CREB. The results of these experiments showed that overexpression of CREB or KLF4 alone induced a modest increase (2-fold and ~3.6-fold, respectively, $p < 0.001$) of apoE promoter activity (Fig. 4B, CREB and KLF4 columns), whereas concomitant overexpression of KLF4 and CREB enhanced synergistically the activity of apoE promoter (Fig. 4B, KLF4 + CREB column) at a level significantly higher (~17-fold, $p < 0.001$) than that obtained with CREB or KLF4 overexpression alone. Note that this apoE promoter induction by KLF4 is lower than that obtained in Fig. 3 since the amount of plasmid used in KLF4 and CREB co-transfection experiments was one-half as compared with that used in KLF4 transfection (Fig. 4). These results revealed that the increase in apoE promoter activity induced by KLF4 is further enhanced by CREB.

To test the ability of CREB to directly bind to apoE promoter, we performed DNAP assay, using whole cell extract from PMA-differentiated macrophages (expressing KLF4) and THP-1 monocytes (which do not express KLF4). The results showed that in macrophages, CREB bound to the full-length apoE promoter sequence (Fig. 4B, lane [−500/+4]) and to all apoE promoter deletion mutants tested (Fig. 4B, lanes [−500/−330], [−350/−274], [−300/−170] and [−200/+4]). By contrast, only a very faint binding

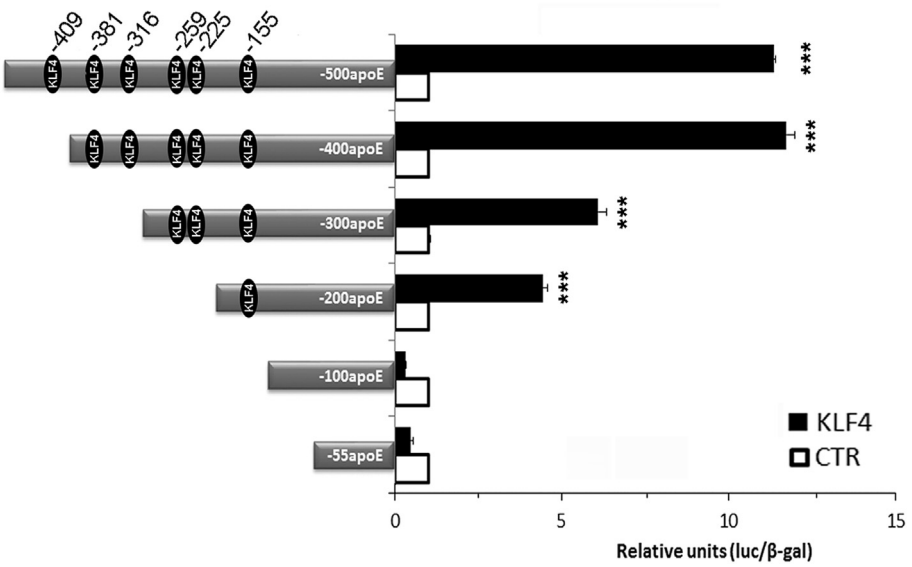


Fig. 3. Deletion of KLF4 binding sites abrogates the up-regulatory effect of KLF4 on apoE promoter activity. HepG2 cells were transiently transfected with plasmids containing apoE promoter ([−500/+4]apoE-luc) or successive deletion mutants in the presence or in the absence of KLF4 expression vector. The presence of KLF4 binding sites localized in positions schematically illustrated, allows KLF4 binding and activation of apoE promoter (−500apoE column) or its fragments (columns −400apoE, −300apoE and −200apoE). The label *** was attributed for $p < 0.001$. Further deletions abrogate the ability of KLF4 to enhance apoE promoter (columns −100apoE and −55apoE), demonstrating that the resulting apoE promoter fragments lack KLF4 binding sites.

on apoE promoter [−500/+4] and traces on fragment [−300/−170] were detected when monocytes cell extract was used (Fig. 4C, lanes [−500/+4] and [−300/−170]). Note that in monocytes no binding was detected for the fragment [−350/−274], for which the strongest binding was obtained when macrophage extract was used (Fig. 4B, lanes [−350/−274]). These data indicated a robust CREB binding on apoE promoter only when KLF4 was present.

4. Discussion

Macrophage-derived apoE has a protective effect on the initiation and progression of atherosclerotic lesions, by promoting cholesterol efflux from these sites [23]. The absence of apoE secretion from the macrophages is pro-atherogenic, and determines the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice [24]. Thus, to increase apoE gene expression in macrophages, an elaborate study of the transcription factors involved in cell-specific up-regulation would constitute a notable strategy to prevent or treat atherosclerosis. In this study, we questioned whether KLF4 could be involved in the regulation of apoE gene expression since this transcription factor regulates several cellular processes [6,25,26] and was reported to have a protective role in atherosclerosis [27]; moreover, KLF4 deficiency is considered a major risk factor for this pathology [10].

Our experiments showed that KLF4 and apoE have similar expression patterns in monocytes and macrophages, namely they are absent or below the limit of detection in monocytes, but they are strongly expressed in macrophages (Fig. 1A). These results corroborate and are in line with previous reports showing an association of KLF4 expression with monocyte differentiation [6,9]. We also have data showing that KLF4 induction is related to monocyte differentiation, but not to PMA treatment, since the latter is unable to induce KLF4 in other cell lines such as HepG2 cells, HEK-293, smooth muscle cells or endothelial cells (data not shown).

It is worthwhile mentioning that KLF4 is induced in response to pro-inflammatory stimuli, like in lipopolysaccharides (LPS) - treated monocytes [9,28]. Similarly, apoE gene expression is absent in THP-1 monocytes, but is induced in activated macrophages (LPS- stimulated monocytes), as we have previously demonstrated [20].

Considering this differential expression pattern in monocytes versus macrophages for both apoE and KLF4, we then searched for the possible action of KLF4 on apoE induction in macrophages.

In silico analysis using TRANSFAC database predicted six binding sites for KLF4 transcription factor on apoE promoter. Therefore, we searched for the capability of KLF4 to bind and modulate apoE promoter activity. Herein we bring evidence that KLF4 interacts with apoE promoter (Fig. 1C) and positively regulates its activity in a dose-dependent manner (Fig. 1B). Moreover, DNA pull-down assays confirmed that KLF4 binds to the proximal apoE promoter sequence and to all apoE promoter fragments tested (Fig. 2B). All these fragments contain one or two putative KLF4 binding sites determined by TRANSFAC analysis, as schematically illustrated in Fig. 2B.

To determine the activity of these binding sites we employed a series of deletion mutants of apoE promoter in transient transfection experiments. The data showed that successive deletion of KLF4 binding sites led to a decreased ability of KLF4 to enhance apoE promoter activity, up to the last two fragments tested: [−100/+73] apoE and [−55/+73] apoE, which were not transactivated by KLF4 since they lack the corresponding binding sites (Fig. 3).

It was reported that KLF4 interacts with other transcription factors and modulates the expression of numerous genes. Previous studies have reported that KLF4 cooperates with CREB to modulate the promoter activity of ghrelin [29] or bradykinin B2 receptor [30] genes.

CREB is a transcription factor ubiquitously distributed in various tissues. We have data showing that THP-1 monocytes or derived macrophages, HEK-293, HepG2 cells and other cells express CREB (unpublished results). Moreover, in an animal model, loss of CREB function was associated with cardiovascular risk factors like obesity, hypertension and hyperlipidemia [31]. Furthermore, CREB could promote anti-inflammatory responses through the inhibition

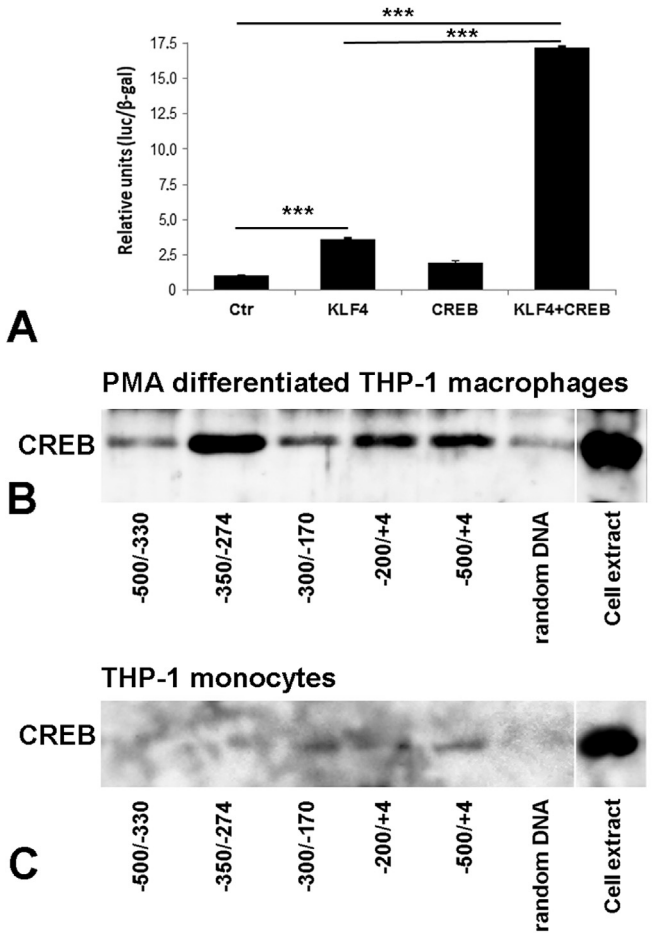


Fig. 4. Synchronized and enhanced action of KLF4 and CREB transcription factors on apoE promoter activity. *Panel A.* HepG2 cells were transiently co-transfected using plasmids containing apoE promoter in the presence of expression vectors for KLF4 and/or CREB. Note that simultaneous overexpression of KLF4 and CREB enhanced significantly the activity of apoE promoter (~17-fold, CREB + KLF4 column) as compared to the cells that overexpress KLF4 (~3.6-fold, KLF4 column) or CREB (~1.9-fold, CREB column) alone. *Panel B and C.* DNA pull-down assays were performed, using biotinylated DNA for apoE promoter ([−500/+4]) or different apoE promoter fragments ([−500/−330], [−350/−274], [−300/−170], [−200/+4]) and cell extracts obtained from THP-1 derived macrophages (B) or from THP-1 monocytes (C). Note that in macrophages, CREB binds to apoE promoter (lane [−500/+4]) and to all apoE promoter fragments used (Panel B, lanes [−500/−330], [−350/−274], [−300/−170] and [−200/+4]). By contrast, in monocytes (that do not express KLF4) a very weak binding of CREB on [−500/+4] apoE promoter and traces on [−300/−170] fragment are detected (lanes [−500/+4], [−300/−170]). As negative control, random DNA was used (lanes random DNA). Note that CREB is strongly expressed in both cell types (lanes cell extract).

of NF-κB [12], a transcription factor we previously found to down-regulate apoE expression [19,20].

In the experiments reported herein, we showed that over-expression of CREB in HepG2 cells did not affect, or, at most, induced a very modest up-regulatory effect on apoE promoter (Fig. 4A). Moreover, CREB did not bind to apoE promoter in monocytes (Fig. 4C). Interestingly, both these cell types, HepG2 cells (data not shown) and THP-1 monocytes (Fig. 1) do not express KLF4. Hence, we questioned the role of CREB transcription factor in KLF4- mediated apoE gene induction. Our transient co-transfection experiments revealed that KLF4 and CREB overexpression had a synergistic effect on apoE promoter activity (Fig. 4A). To depict CREB binding on apoE promoter in the presence or absence of KLF4, we used macrophages and respectively, monocytes, both heavily expressing CREB (Fig 4B and C, lanes Cell extract). DNAP assay showed that CREB bound strongly to apoE promoter only in macrophages, the cells that express KLF4 (Fig. 4B), whereas in monocytes, the binding was very weak or even absent (Fig. 4C).

In conclusion, the novel findings of the current study are: *(i)* there is a strong synchronized induction of KLF4 and apoE expression during differentiation of monocyte-derived macrophages; *(ii)* KLF4 up-regulates apoE gene in a dose-dependent manner; *(iii)* biologically active KLF4 binding sites are present on apoE promoter and *(iv)* the interaction of KLF4 with CREB results in an enhanced up-regulatory effect of KLF4 on apoE promoter.

Taken together these data provide novel knowledge on apoE gene modulation mechanism, and recommend KLF4 as a promising target for atherosclerosis therapy.

Acknowledgments

This work was supported by a grant of the Romanian National Authority for Scientific Research, CNCS – UEFISCDI, project number PN-II-ID-PCE-2011-3-0591 (granted to AG), and by the Romanian Academy. S. Stavri acknowledges the support of the strategic grant POSDRU/159/1.5/S/133391-financed by the European Social Fund within the Sectorial Operational Program Human Resources Development 2007–2013. S. Stavri thanks Dr. Manuela Calin for useful discussions. The authors thank Dr. Ovidiu Croitoru for graphic design and to Elena Fuior for pertinent comments.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.163.

References

[1] J.M. Shields, R.J. Christy, V.W. Yang, Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest, J. Biol. Chem. 271 (1996) 20009–20017.
[2] S.F. Yet, M.M. McA'Nulty, S.C. Folta, et al., Human EZF, a Kruppel-like zinc finger protein, is expressed in vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression domains, J. Biol. Chem. 273 (1998) 1026–1031.
[3] B. Zheng, M. Han, J.K. Wen, Role of Kruppel-like factor 4 in phenotypic switching and proliferation of vascular smooth muscle cells, IUBMB Life 62 (2010) 132–139.
[4] J.M. Shields, V.W. Yang, Identification of the DNA sequence that interacts with the gut-enriched Kruppel-like factor, Nucleic Acids Res. 26 (1998) 796–802.
[5] L.A. Garrett-Sinha, H. Eberspaecher, M.F. Seldin, et al., A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells, J. Biol. Chem. 271 (1996) 31384–31390.
[6] M.W. Feinberg, A.K. Wara, Z. Cao, et al., The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation, EMBO J. 26 (2007) 4138–4148.
[7] X. Liao, N. Sharma, F. Kapadia, et al., Kruppel-like factor 4 regulates macrophage polarization, J. Clin. Invest 121 (2011) 2736–2749.
[8] A. Hamik, Z. Lin, A. Kumar, et al., Kruppel-like factor 4 regulates endothelial inflammation, J. Biol. Chem. 282 (2007) 13769–13779.
[9] J.K. Alder, R.W. Georgantas 3rd, R.L. Hildreth, et al., Kruppel-like factor 4 is essential for inflammatory monocyte differentiation in vivo, J. Immunol. 180 (2008) 5645–5652.
[10] N. Sharma, Y. Lu, G. Zhou, et al., Myeloid Kruppel-like factor 4 deficiency augments atherogenesis in ApoE-/- mice–brief report, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 32 (2012) 2836–2838.
[11] T. Ichiki, Role of cAMP response element binding protein in cardiovascular remodeling: good, bad, or both? Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26 (2006) 449–455.
[12] A.Y. Wen, K.M. Sakamoto, L.S. Miller, The role of the transcription factor CREB in immune function, J. Immunol. 185 (2010) 6413–6419.
[13] D.L. Williams, P.A. Dawson, T.C. Newman, et al., Synthesis of apolipoprotein E by peripheral tissues. Potential functions in reverse cholesterol transport and cellular cholesterol metabolism, Ann. N. Y. Acad. Sci. 454 (1985) 222–229.
[14] R.W. Mahley, Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology, Science 240 (1988) 622–630.
[15] J.L. Goldstein, M.S. Brown, The LDL receptor, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 29 (2009) 431–438.
[16] S.H. Zhang, R.L. Reddick, J.A. Piedrahita, et al., Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E, Science 258 (1992) 468–471.
[17] R.L. Reddick, S.H. Zhang, N. Maeda, Atherosclerosis in mice lacking apo E.

Evaluation of lesional development and progression, Arterioscler. Thromb. 14 (1994) 141–147.
[18] V.G. Trusca, E.V. Fuior, I.C. Florea, et al., Macrophage-specific up-regulation of apolipoprotein E gene expression by STAT1 is achieved via long range genomic interactions, J. Biol. Chem. 286 (2011) 13891–13904.
[19] S. Stavri, V.G. Trusca, M. Simionescu, et al., Metformin reduces the endotoxin-induced down-regulation of apolipoprotein E gene expression in macrophages, Biochem. Biophys. Res. Commun. 461 (2015) 435–440.
[20] A.V. Gafencu, M.R. Robciuc, E. Fuior, et al., Inflammatory signaling pathways regulating ApoE gene expression in macrophages, J. Biol. Chem. 282 (2007) 21776–21785.
[21] M.L. Cruceru, A.M. Enciu, A.C. Popa, et al., Signal transduction molecule patterns indicating potential glioblastoma therapy approaches, Onco Targets Ther. 6 (2013) 1737–1749.
[22] V. Matys, O.V. Kel-Margoulis, E. Fricke, et al., TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes, Nucleic Acids Res. 34 (2006) D108–D110.
[23] R. Ross, The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, Nature 362 (1993) 801–809.
[24] S. Fazio, V.R. Babaev, A.B. Murray, et al., Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (1997) 4647–4652.
[25] T. Yoshida, M. Hayashi, Role of Kruppel-like factor 4 and its binding proteins in vascular disease, J. Atheroscler. Thromb. 21 (2014) 402–413.
[26] P. Kunes, Z. Holubcova, J. Krejsek, Occurrence and significance of the nuclear transcription factor Kruppel-like factor 4 (KLF4) in the vessel wall, Acta Medica (Hradec Kralove) 52 (2009) 135–139.
[27] I. Tabas, G. Garcia-Cardena, G.K. Owens, Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis, J. Cell Biol. 209 (2015) 13–22.
[28] J. Liu, H. Zhang, Y. Liu, et al., KLF4 regulates the expression of interleukin-10 in RAW264.7 macrophages, Biochem. Biophys. Res. Commun. 362 (2007) 575–581.
[29] H.J. Lee, Y.M. Kang, C.S. Moon, et al., KLF4 positively regulates human ghrelin expression, Biochem. J. 420 (2009) 403–411.
[30] Z. Saifudeen, S. Dipp, H. Fan, et al., Combinatorial control of the bradykinin B2 receptor promoter by p53, CREB, KLF-4, and CBP: implications for terminal nephron differentiation, Am. J. Physiol. Ren. Physiol. 288 (2005) F899–F909.
[31] I.E. Schauer, L.A. Knaub, M. Lloyd, et al., CREB downregulation in vascular disease: a common response to cardiovascular risk, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 30 (2010) 733–741.

Biochemical and Biophysical Research Communications 461 (2015) 435–440

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Metformin reduces the endotoxin-induced down-regulation of apolipoprotein E gene expression in macrophages

Simona Stavri, Violeta G. Trusca, Maya Simionescu, Anca V. Gafencu*

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", Bucharest, Romania

ARTICLE INFO

Article history:
Received 6 April 2015
Available online 18 April 2015

Keywords:
Metformin
Apolipoprotein E
NF-κB
Macrophages
Multienhancer
LPS

ABSTRACT

The atheroprotective role of macrophage-derived apolipoprotein E (apoE) is well known. Our previous reports demonstrated that inflammatory stress down-regulates apoE expression in macrophages, aggravating atherogenesis. Metformin, extensively used as an anti-diabetic drug, has also anti-inflammatory properties, and thus confers vascular protection. In this study, we questioned whether metformin could have an effect on apoE expression in macrophages in normal conditions or under lipopolysaccharide (LPS)-induced stress. The results showed that metformin slightly increases the apoE expression only at high doses (5–10 mM). Low doses of metformin (1–3 mM) significantly reduce the LPS down-regulatory effect on apoE expression in macrophages. Our experiments demonstrated that LPS-induced NF-κB binds to the macrophage-specific distal regulatory element of apoE gene, namely to the multienhancer 2 (ME.2) and its 5′-deletion fragments. The NF-κB binding on ME.2 and apoE promoter has a down-regulatory effect. In addition, data revealed that metformin impairs NF-κB nuclear translocation, and thus, improves the apoE levels in macrophages under inflammatory stress. The positive effect of metformin in the inflammatory states, its clinical safety and low cost, make this drug a potential adjuvant in the therapeutic strategies for atherosclerosis.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Metformin (1,1-dimethylbiguanide), a widely prescribed drug for the type 2 diabetes, exhibits beside its anti-hyperglycemic effect [1], anti-hyperlipidemic [2] and anti-inflammatory properties [3]. Cardiovascular protection and survival benefits of metformin in diabetic patients were revealed [4]. Numerous evidence indicated that metformin attenuates pro-inflammatory response in various cell types, including endothelial cells and human vascular smooth muscle cells [3,5,6], and ameliorates macrophage activation [7]. Although its mechanism of action is still not fully understood, there are reports indicating the intracellular signalling pathways modulated by metformin, through AMPK-dependent mechanisms [3,8,9] or AMPK-independent mechanisms, including the inhibition of p70S6K1 kinase [10], protein kinase C and p38 MAPK [11]. In endothelial cells, metformin inhibits NF-κB activation, attenuating the induction of various pro-inflammatory cell adhesion molecules [5].

Apolipoprotein E (apoE) plays a key role in the lipid metabolism [12,13]. ApoE deficiency involves the accumulation of lipoprotein remnants in the plasma, leading to atherosclerosis [14]. ApoE is primarily synthesized in the liver, but is also expressed by various cell types [15], including macrophages, cells playing a significant role in atherogenesis [16]. ApoE secreted by macrophages localized in the atherosclerotic plaque is involved in the cholesterol efflux from this site. In macrophages, the apoE gene regulation implies a highly complex regulatory process requiring the cooperation between the proximal and distal regulatory elements. In the absence of the enhancers, the apoE promoter is not able to direct the gene transcription *in vivo* [17]. Two homologous

Abbreviations: AMPK, adenosine-monophosphate-activated protein kinase; apoE, apolipoprotein E; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CD36, cluster of differentiation 36; Cox2, cyclooxygenase 2; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; DNAP, DNA Pull-down Assays; FBS, foetal calf serum; h, hours; IFN-γ, interferon gamma; iNOS, inducible nitric oxide synthase; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; luc, luciferase; Mf, metformin; ME, multienhancer; MPM, murine peritoneal macrophages; NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; p38 MAPK, p38 mitogen-activated protein kinase; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; TFIID, transcription factor II D; TNFα, tumour necrosis factor alpha.

* Corresponding author. Department of Genomics, Transcriptomics and Molecular Therapies, Institute of Cellular Biology and Pathology, "Nicolae Simionescu", 8, B.P. Hasdeu Street, Bucharest 050568, Romania.
E-mail address: anca.gafencu@icbp.ro (A.V. Gafencu).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.057
0006-291X/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

enhancers involved in macrophage and brain specific apoE expression, multienhancer-1 (ME.1) and multienhancer-2 (ME.2), were identified [18]. Our previous reports demonstrated that the endotoxin stress down-regulates the apoE expression in macrophages [19]. These data indicate that even if apoE could exert a beneficial effect at the atheromatous lesion site, it is diminished by the modulatory impact of the inflammatory factors. We hypothesise that a drug attenuating the negative effects of inflammation could compensate the regulatory balance of apoE expression in macrophages and thus, would restore the cholesterol efflux from the atherosclerotic plaque.

Considering all these data, the aim of our current study was to investigate the modulatory potential of metformin on apoE expression in macrophages in normal and inflammatory states and to reveal its mechanism. We report herein that in normal conditions, metformin has a modest upregulatory effect on apoE gene in macrophages, but, more important, this drug significantly diminishes the inflammatory stress-induced down-regulation of apoE, through the inhibition of NF-κB nuclear translocation.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Metformin (1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride), LPS *E. coli* 0111:B4 and Bay-11-7082 were from Sigma–Aldrich. DMEM, RPMI-1640 and FBS were from EuroClone (MI, Italy). Enhance chemiluminescence kit was from Pierce (Rockford, USA). GoTaq DNA polymerase, PMA and Luciferase assay system were from Promega (Madison, WI). RNA isolation kit was from Analytic Jena (Germany). The oligo(dT), M-MLV reverse transcriptase, and Dynabeads M-280 streptavidin were from Life Technologies. TaqMan probes for apoE (Mm01307193_g1) and actin (Mm00607939_s1) were from Applied Biosystems. Protease Inhibitors cocktail was from Roche. Nuclear Extract kit was from Active Motif (Rixensart, Belgium). Thioglycolate medium was from HiMedia (Mumbai, India). All the antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), excepting anti-human apoE, which was from Immuno-Biological Laboratories Co., LTD. (Japan).

2.2. Cell culture and treatment

Thioglycollate elicited MPM were isolated from C57BL/6J mice. MPM and THP-1 cells were cultured in RPMI with 10% heat-inactivated FBS. THP-1 monocytes differentiation was induced by 7 h exposure to 50 nM PMA; then, PMA was removed and THP-1 macrophages were maintained in culture for 10 days, until further processing. RAW 264.7 cells were cultured in low glucose DMEM and 10% FBS.

2.3. Quantitative real time-PCR

MPM were incubated with different metformin concentrations for 16 h in the presence or absence of 500 ng/ml LPS, and then total RNA was extracted using a kit from Analytic Jena and revers-transcribed into cDNA. ApoE expression was quantified by Real Time-PCR using TaqMan probes for apoE and β-actin (as reference), in a 7900HT Fast Real Time-PCR system (Applied Biosystems). The relative apoE expression was calculated using RQ Manager Software.

2.4. Western blot

The samples obtained from THP-1 differentiated monocytes treated for 16 h with metformin were subjected to SDS-PAGE and then transferred on a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Blocked membranes were incubated with anti-apoE and anti-actin antibodies, followed by HRP-conjugated secondary antibodies. To determine NF-κB p50 subunit distribution between nuclear and cytoplasmic fractions, THP-1 macrophages were 2 h pre-treated with 1 mM metformin and then incubated 4 h with 1 μg/ml LPS and 1 mM metformin. Then, the nuclear and cytoplasmic fractions obtained as described [19] were subjected to SDS-PAGE. After transfer, the blots were incubated with anti-p50, anti-actin or anti-TFIID antibodies, followed by HRP-conjugated secondary antibodies. The proteins were revealed using a chemiluminescence kit and LAS-4000 Chemiluminescent Image Reader (FUJIFILM Europe GmbH, Germany), and quantified using TotalLab Software.

2.5. DNA pull-down assays

This assay was done as we previously described [19], except the following: (i) the primers used for biotinylation were: forward biotinylated RV3 primer (5′-CTAGCAAAATAGGCTGTCCC; Promega) that anneal on pGL3 plasmid and reverse primer 5′-AAGAGCT-CATCCCCGTGCCCCCG for apoE promoter, and 5′-CAAAGCTCT-GAGTGTATGCCCC for ME.2 or its fragments; (ii) the templates used were the plasmids in which the corresponding promoter or ME.2 fragments were previously cloned; (iii) the nuclear extract was prepared from RAW 264.7 cells incubated 18 h with LPS, using a kit from Active Motif. The protein-DNA complexes were subjected to Western blotting using anti-p50 antibodies.

2.6. Transient transfections

RAW 264.7 cells were transfected by calcium phosphate method with following plasmids in which were cloned: (i) apoE proximal promoter ([−500/+73]apoE-luc), (ii) ME.2 (ME-luc), or (iii) apoE promoter and ME.2 (ME[−500/+73]apoE-luc), as described [20]. Eighteen hours from transfection, the medium was changed and the transfected cells were 3 h pre-treated with 1 mM metformin and then incubated for 21 h with 1 μg/ml LPS together with 1 mM metformin. Then, the cells were lysed, and the reporter gene activity was determined as previously reported [20]. All the experiments were done in triplicates and repeated three times.

2.7. Statistical analysis

The results were statistically analysed using One-way ANOVA and graphs show the means ± standard deviation. Statistical significance was considered when p values <0.05.

3. Results

3.1. The effect of metformin on apoE expressed by macrophages in normal and endotoxin-stressed states

The apoE gene expression modulation induced by metformin was evaluated on MPM exposed (16 h) to different metformin concentrations (1–10 mM), by Real Time-PCR, using TaqMan probes. The results showed that the apoE mRNA levels were slightly but significantly increased by 5 mM and 10 mM metformin (~1.5 times as compared with control cells, $p < 0.001$), whereas smaller concentrations (1 mM and 3 mM) did not change the apoE gene expression (Fig. 1A). The apoE protein levels in (16 h) metformin-treated THP-1 macrophages were slightly increased after incubation with 5 mM (~1.57 times) and 10 mM (~1.77 times) metformin, as compared to control (Fig. 1B).

To test the ability of metformin to exert its anti-inflammatory properties and diminish the down-regulatory effect of the

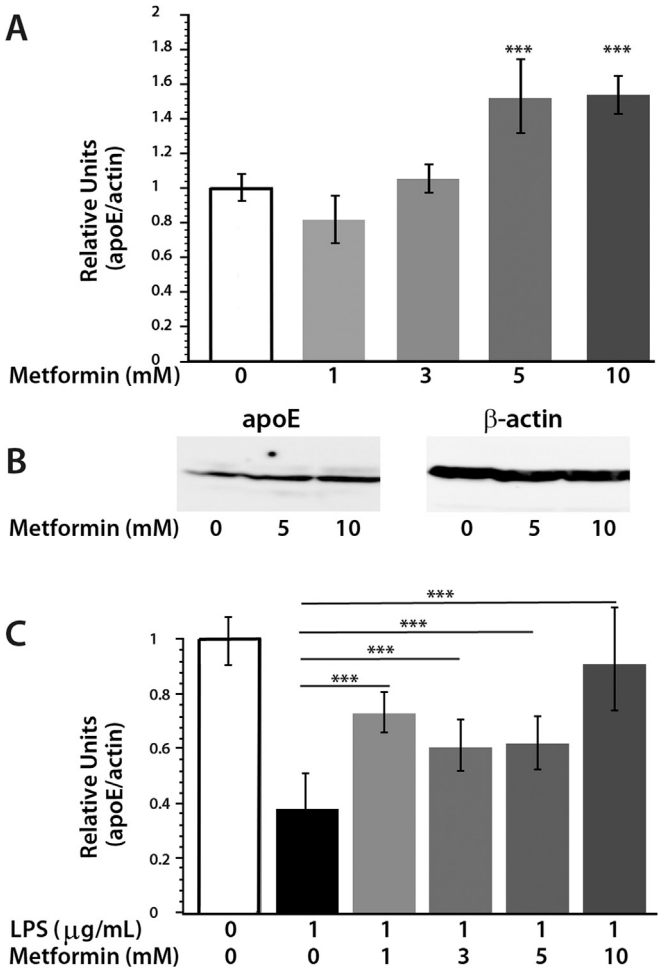


Fig. 1. The effect of metformin on apoE expression in macrophages in normal conditions (A, B) or under endotoxin stress (C). Lower concentrations of metformin (1–3 mM) do not increase the apoE gene expression in macrophages, while higher doses (5–10 mM) increase apoE mRNA levels, as evaluated by RT-PCR (A). ApoE protein levels are increased by high metformin doses (5–10 mM), as determined by Western blotting (B). Metformin significantly reduces the LPS down-regulatory effect on apoE expression in macrophages, as determined by RT-PCR (C).

inflammatory stress on the apoE expression, MPM were treated (16 h) with various concentrations of metformin (1–10 mM) together with LPS and then the apoE expression was analysed by Real Time-PCR. The results presented in Fig. 1C showed that apoE gene expression decreased to 34.9% in LPS-treated cells as compared to control cells ($p < 0.001$), but LPS-induced down-regulation of apoE mRNA was significantly reduced by metformin. Thus, the apoE expression reached ~72.7% of the control values when the cells were simultaneously treated with 1 mM metformin and LPS, ~60.4% and ~61.2% from control for 3 mM and 5 mM metformin in the presence of LPS, respectively. In the case of treatment with 10 mM metformin, the LPS down-regulatory effect on apoE was almost completely reverted.

The LPS-induced inflammatory stress involves NF-κB activation that represents, at least in part, the mechanism of apoE down-regulation in macrophages [19]. Based on this data, we examined whether metformin has the capacity to revert the negative effect of LPS on the apoE regulatory elements. For this, we performed transient transfections on RAW 264.7 cells, using plasmids containing ME.2 along with the proximal region of apoE promoter, cloned in pGL3 basic vector (ME.2[−500/+73]apoE-luc). Transiently transfected cells were: (i) incubated with 1 μg/ml LPS for 24 h; (ii) pre-treated for 3 h with 1 mM metformin and then incubated for 21 h with 1 μg/ml LPS together with 1 mM metformin; (iii) treated with 1 mM metformin for 24 h. As illustrated in Fig. 2, LPS reduced the activity of the construct containing the apoE promoter and ME.2 to a value of ~10% of the control (Fig. 2, LPS column). When transiently transfected macrophages were incubated simultaneously with LPS and metformin, the inhibitory effect of LPS on apoE promoter/ME.2 activity was significantly decreased, the value obtained representing ~70% ($p = 0.01$) of the control (Fig. 2, LPS + Mf column). The treatment of the transfected macrophages with 1 mM metformin had no significant effect on apoE promoter activity (Fig. 2, Mf column).

3.2. Metformin interferes with NF-κB nuclear translocation

To study the ability of metformin to inhibit the NF-κB translocation in the nucleus, THP-1 differentiated macrophages were incubated with metformin or simultaneously with metformin and LPS (4 h). Then, nuclear and cytoplasmic fractions were prepared using the treated cells and analysed by Western blotting for NF-κB p50 distribution. The results showed that THP-1 macrophages exposed to LPS exhibited an accumulation of NF-κB p50 subunit in the nuclear fraction (Fig. 3, lane 'LPS') as compared to control (Fig. 3, lane 'ctr'). In contrast, 2 h pre-incubation of THP-1 differentiated macrophages with 1 and 10 mM metformin attenuated by ~96%, and 89% respectively the nuclear accumulation of the NF-κB p50 subunit (Fig. 3, lane 'LPS+1 mM Mf', and 'LPS+10 mM Mf'), an effect similar to that of the known NF-κB inhibitor, Bay-11-7082 (Fig. 3, lane 'LPS + Bay'). In cells treated only with metformin (1 or 10 mM) as well as with Bay-11-7082, p50 remains in the cytoplasmic fraction (Fig. 3, lanes '1 mM Mf', '10 mM Mf' and 'Bay'). As control for the protein loading, TFIID was analysed (Fig. 3, TFIID). The intensity graph of p50 nuclear localization is illustrated in the Fig. 3. In the cytoplasmic fraction, the precursor of p50 and actin were found in each sample analysed (Fig. 3, cytoplasmic fraction).

3.3. NF-κB p50 subunit binds on apoE promoter and multienhancer

Considering that LPS-induces p50 nuclear translocation, we further tested the ability of NF-κB p65/p50 heterodimer to bind on the apoE regulatory elements. First, we performed DNAP assays to test the p50 binding to ME.2, using the biotinylated [1-619 ME.2] DNA and nuclear extracts prepared from RAW 264.7 cells treated with 1 μg/ml LPS for 24 h. The results showed that p50 proteins

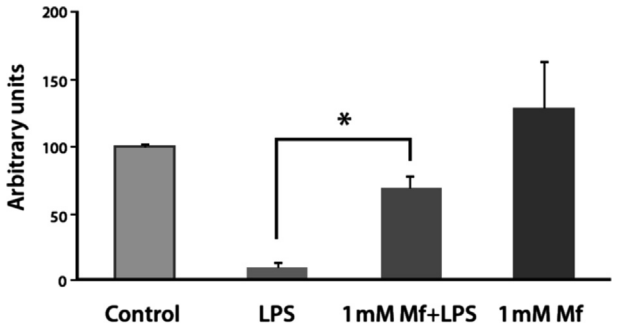


Fig. 2. Metformin diminishes the negative effect of LPS on the activity of apoE promoter and multienhancer in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 macrophages were transiently transfected with ME.2[−500/+73]apoE-luc construct, and treated with 1 μg/ml LPS or 1 mM metformin in the presence or absence of LPS. The treatment with 1 mM metformin significantly reduced the inhibitory effect of LPS (LPS column) on apoE promoter/ME.2 activity (LPS + Mf column) as compared with the control, while 1 mM metformin has no significant effect on apoE regulatory elements (Mf column).

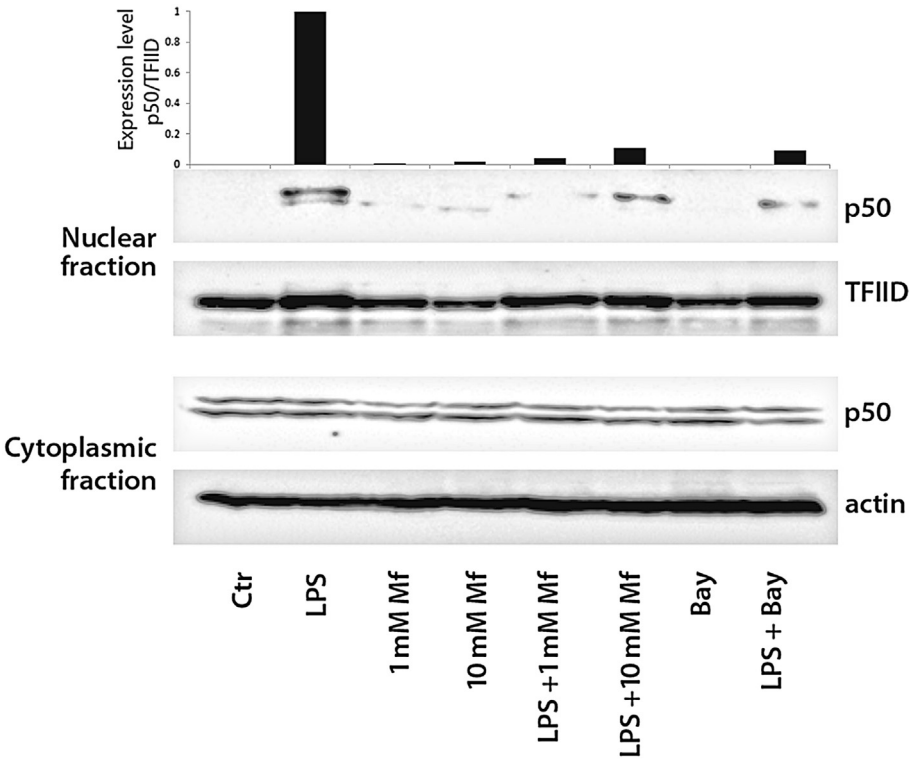


Fig. 3. Metformin inhibits NF-κB nuclear translocation. The nuclear and cytoplasmic distribution of NF-κB p50 subunit in response to LPS in the presence or absence of metformin, in THP-1 derived macrophages, was determined by Western Blotting using anti-p50 antibodies. Cells treated 4 h with LPS present an accumulation of p50 in the nuclear fraction (lane 'LPS') as compared with the control (lane 'ctr'), while metformin treatment attenuates p50 nuclear accumulation (lane 'LPS+1 mM Mf', and lane 'LPS+10 mM Mf'), an effect similar with that of Bay-11-7082 (lane 'LPS + Bay'). In the absence of LPS, Bay-11-7082 has no significant effect on p50 distribution (lane 'Bay'). As control for the protein loading, TFIID (for the nuclear fraction) and β-actin (for the cytoplasmic fraction) were assessed. The normalised p50 expression level in the nuclear fraction was also graphically represented. In the cytoplasmic fraction, the precursor of p50 is observed in each sample analysed.

bind to the whole ME.2 sequence in LPS-treated macrophages (Fig. 4A, lane '1-619 ME'). Then to check for the localization of NF-κB p50 subunit binding site on ME.2, DNAP assays using two 5′ deletion fragments (249-619 ME and 407-619 ME) were performed. The results showed that both deletion fragments were able to bind NF-κB p50 subunit (Fig. 4A, lane '249-619 ME', and '407-619 ME'). As positive control, we used the apoE promoter (Fig. 4A, lane 'apoE promoter') previously shown to bind NF-κB [19], and a validated sequence for NF-κB binding (Fig. 4A, lane 'NF-κB'). As negative control, a DNA sequence containing the glucocorticoid receptor binding site was employed and no band was detected (Fig. 4A, lane 'Random DNA').

The functionality of the NF-κB binding sites found on apoE regulatory elements was assessed by transient transfection experiments. RAW 264.7 macrophages transfected with the following plasmids: [−500/+73]apoE-luc, ME.2/[−500/+73]apoE-luc and ME.2-luc were incubated (24 h) in medium containing or not 1 μg/ml LPS. The activity of apoE promoter in the presence or absence of ME.2 (Fig. 4B, columns ME.2/[−500/+73]apoE, and −500/+73apoE, respectively) as well as that of ME.2 (Fig. 4B, columns ME.2) was significantly decreased by LPS (black columns) to ~5–7% ($p < 0.001$) from the control values (white columns).

4. Discussion

Metformin is a drug discovered in the 1920s, intensively used for treating patients with type 2 diabetes mellitus, being currently prescribed to over 100 million patients worldwide. Several clinical studies indicate its beneficial effects in improving the survival rate for type 2 diabetes patients [21–23]. The main effect of metformin is the inhibition of the glucose production in the liver [24]. Metformin was shown to be efficient in treating diseases with an inflammatory component, such us uveitis [25], and polycystic ovary syndrome [26]. Moreover, Forouzandeh and co-workers, using non-diabetic mice models, reported that metformin has vasculoprotective effects in attenuating atherosclerosis [27].

Apolipoprotein E has an atheroprotective role being implicated in lipoprotein clearance and cholesterol efflux. ApoE deficiency leads to atherosclerosis [14]. Its beneficial properties in cholesterol efflux can be achieved only when apoE reaches the core of the atherosclerotic plaque. At this site, apoE is secreted by the macrophages differentiated from the infiltrated monocytes. Our previous data revealed that inflammatory factors, such as LPS, repress apoE gene expression in macrophages [19]. One can safely assume that restoring apoE levels expressed by macrophages could contribute to slow down the progression of atherosclerosis and may diminish the atherosclerotic plaque.

Therefore, in this study we investigated a possible intervention in the inflammatory stress signalling pathways leading to apoE gene down-regulation in macrophages, in order to attenuate its effect. Our data showed that only high doses (5–10 mM) of metformin slightly increase apoE gene expression in macrophages (Fig. 1A and B). However, particularly interesting results showed that although lower concentrations of metformin (1–3 mM) did not increase the apoE mRNA level, these concentrations were enough to reverse the down-regulatory effect of LPS on apoE gene expression (Fig. 1C). In good agreement with these results, we demonstrated that the activity of apoE regulatory elements that was decreased by LPS was significantly restored by 1 mM metformin treatment (Fig. 2).

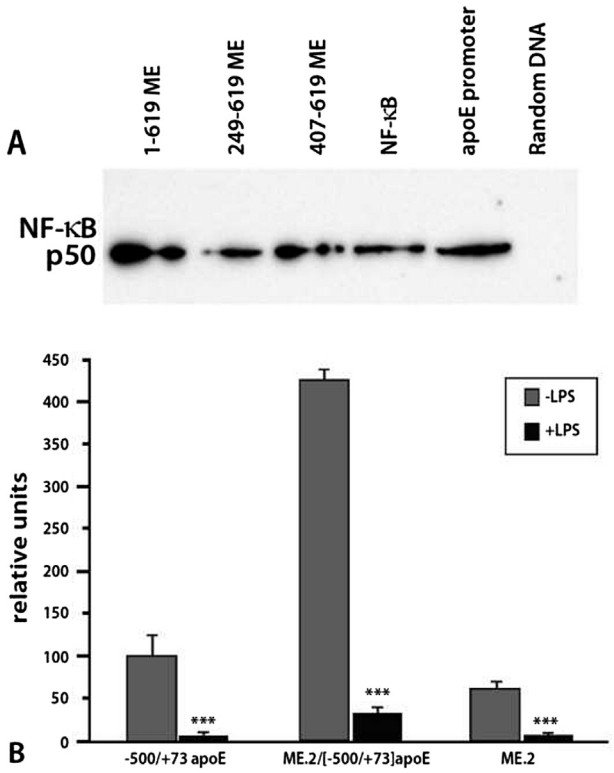


Fig. 4. Interaction of NF-κB p50 subunit with apoE promoter and multienhancer. Panel A. DNAP experiments for NF-κB p50 subunit. The whole ME.2, [249-619 ME] or [407-619 ME] fragments and apoE promoter bind p50 (lanes '1-619 ME', '249-619 ME', '407-619 ME, and 'apoE promoter', respectively). No bands appear in the negative control (lane 'Random DNA'); as positive control, a consensus sequence for NF-κB was used (lane 'NF-κB'). Panel B. Down-regulation of apoE promoter and multienhancer in RAW 264.7 macrophages by LPS, as revealed by transient transfections.

These data are well integrated in the context of anti-inflammatory properties of metformin. The anti-inflammatory effects of metformin in cells involved in atherosclerotic plaque formation, such as vascular smooth muscle cells, endothelial cells and macrophages were reported by different research groups. It was demonstrated that metformin attenuated TNFα-induced gene expression of pro-inflammatory and cell adhesion molecules in endothelial cells [5], inhibited IL-1β-induced IL-6 and IL-8 expression [3,28], and drastically reduced the expression of pro-inflammatory cytokines (TNFα, IL-6, and IFN-γ), iNOS and Cox2 in LPS-treated macrophages [29]. Similar effects of metformin were reported by Hyun et al., for IL-4, IL-10, iNOS, Cox2, IL-1β, IL-6, TNFα; in addition, metformin reduced the level of CD36 and scavenger receptor A in LPS-treated RAW 264.7 cells and MPM [28]. Metformin inhibited high-mobility group protein B1 release, and thus improved the survival in a murine model of lethal endotoxemia [30]. A recent study has shown that metformin suppresses liver inflammation in obesity-associated non-alcoholic fatty liver disease by decreasing the LPS-induced pro-inflammatory cytokines, c-Jun N-terminal protein kinase 1 phosphorylation and NF-κB activation in hepatocytes and macrophages [31].

According to Buldak et al., metformin can direct macrophages toward alternative activation, this phenotype being involved in the healing processes and repression of inflammation [32]. Moreover, Sag et al. suggested that the macrophage polarization and the switch between the pro-to anti-inflammatory state, may be induced by AMPK through distinct regulation of some transcription factors such as: inhibition of NF-κB and activation of Protein kinase B and cAMP response element binding protein [33]. AMPK-activation was described as the first signalling pathway of metformin action which drives a multitude of alternative downstream molecules leading to various effects, as recently reviewed [34]. Our current study indicates that, in macrophages, metformin prevents NF-κB activation, blocking the NF-κB nuclear translocation (Fig. 4). Similar mechanisms were reported for the inhibition of various pro-inflammatory cytokines (TNFα, IL-6, IL-1β and IFN-γ) production and LPS-induced iNOS and Cox2 expression in macrophages treated with metformin [28,29]. Moreover, this mechanism was also demonstrated for other cell types, such as smooth muscle cells in which metformin treatment inhibited IL-1β-induced IL-6 and IL-8 expression via a mechanism involving reduction of the nuclear translocation of NF-κB [3].

We investigated whether NF-κB has binding sites on apoE regulatory elements in macrophages. The DNA Pull-down assays indicated that NF-κB p50 subunit could bind on ME.2, that drives the expression in macrophages (Fig. 4A), as well as on the apoE promoter, as previously shown [19]. Moreover, 5'-deletion fragments of ME.2 have also binding capacity for p50. The p65/p50 binding on the apoE regulatory elements decreases their activity (Fig. 4B), leading to the down-regulation of the apoE gene expression in macrophages. Despite this fact, computer analysis of NF-κB binding site on ME.2 and apoE promoter showed no consensus sequences for p50 binding. Thus, an indirect binding of p50/p65 on the apoE regulatory elements is suggested. A similar mechanism was described by Wang et al. for NF-κB-mediated repression of troponin-I2 gene, also lacking NF-κB binding sites; in addition, YinYang1, a transcriptional repressor, was shown to mediate this regulatory process in myoblasts [35].

In conclusion, the novel data of this study are: (i) high doses of metformin slightly increase apoE expression in macrophages; (ii) low doses of metformin up-regulate apoE gene in endotoxin-stressed macrophages; (iii) the mechanism by which metformin counteracts LPS effect involves the inhibition of NF-κB, a transcriptional factor playing an important role in atherosclerosis. The valuable effect of metformin on the cells implicated in atherogenesis, the clinical safety and the low cost, make this drug a potential prospective adjuvant in the therapeutic strategies for atherosclerosis.

Conflict of interest

None

Acknowledgments

This work was supported by a grant of the Romanian National Authority for Scientific Research, CNCS-UEFISCDI, project PN-II-ID-PCE-2011-3-0591 (granted to AG), and by the Romanian Academy. S. Stavri and V.G. Trusca acknowledge the support of the strategic grant POSDRU/159/1.5/S/133391-financed by the European Social Found within the Sectorial Operational Program Human Resources Development 2007–2013. The authors thank Dr. Ovidiu Croitoru for graphic design.

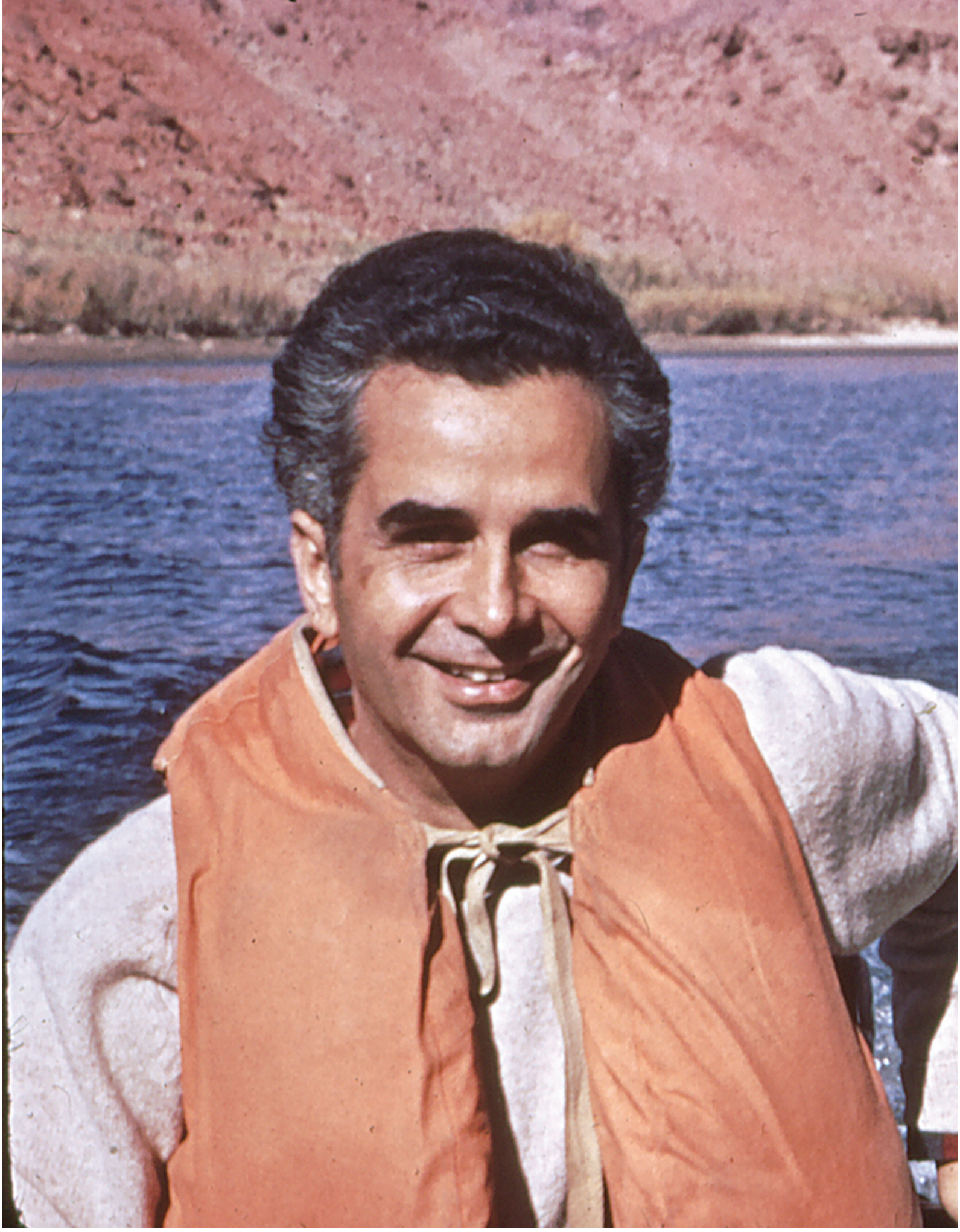
References

[1] C.J. Bailey, R.C. Turner, Metformin, N. Engl. J. Med. 334 (1996) 574–579.
[2] H.Z. Lin, S.Q. Yang, C. Chuckaree, et al., Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice, Nat. Med. 6 (2000) 998–1003.
[3] K. Isoda, J.L. Young, A. Zirlik, et al., Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26 (2006) 611–617.
[4] Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK prospective diabetes study (UKPDS) group, Lancet 352 (1998) 854–865.

[5] Y. Hattori, K. Suzuki, S. Hattori, et al., Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells, Hypertension 47 (2006) 1183–1188.
[6] N.L. Huang, S.H. Chiang, C.H. Hsueh, et al., Metformin inhibits TNF-alpha-induced IkappaB kinase phosphorylation, IkappaB-alpha degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3K-dependent AMPK phosphorylation, Int. J. Cardiol. 134 (2009) 169–175.
[7] J.C. Mamputu, N.F. Wiernsperger, G. Renier, Antiatherogenic properties of metformin: the experimental evidence, Diabetes Metab. 29 (2003), 6S71–S76.
[8] G. Rena, E.R. Pearson, K. Sakamoto, Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? Diabetologia 56 (2013) 1898–1906.
[9] K.A. Coughlan, R.J. Valentine, N.B. Ruderman, et al., AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? Diabetes Metab. Syndr. Obes. 7 (2014) 241–253.
[10] M.C. Towler, D.G. Hardie, AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling, Circ. Res. 100 (2007) 328–341.
[11] R. Saeedi, H.L. Parsons, R.B. Wambolt, et al., Metabolic actions of metformin in the heart can occur by AMPK-independent mechanisms, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 294 (2008) H2497–H2506.
[12] R.W. Mahley, Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology, Science 240 (1988) 622–630.
[13] J.L. Goldstein, M.S. Brown, The LDL receptor, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 29 (2009) 431–438.
[14] S.H. Zhang, R.L. Reddick, J.A. Piedrahita, et al., Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E, Science 258 (1992) 468–471.
[15] D.L. Williams, P.A. Dawson, T.C. Newman, et al., Synthesis of apolipoprotein E by peripheral tissues. Potential functions in reverse cholesterol transport and cellular cholesterol metabolism, Ann. N. Y. Acad. Sci. 454 (1985) 222–229.
[16] I.M. Fenyo, A.V. Gafencu, The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis, Immunobiology 218 (2013) 1376–1384.
[17] V.I. Zannis, H.Y. Kan, A. Kritis, et al., Transcriptional regulatory mechanisms of the human apolipoprotein genes in vitro and in vivo, Curr. Opin. Lipidol. 12 (2001) 181–207.
[18] S.J. Shih, C. Allan, S. Grehan, et al., Duplicated downstream enhancers control expression of the human apolipoprotein E gene in macrophages and adipose tissue, J. Biol. Chem. 275 (2000) 31567–31572.
[19] A.V. Gafencu, M.R. Robciuc, E. Fuior, et al., Inflammatory signaling pathways regulating ApoE gene expression in macrophages, J. Biol. Chem. 282 (2007) 21776–21785.
[20] V.G. Trusca, E.V. Fuior, I.C. Florea, et al., Macrophage-specific up-regulation of apolipoprotein E gene expression by STAT1 is achieved via long range genomic interactions, J. Biol. Chem. 286 (2011) 13891–13904.
[21] L.M. Berstein, Metformin in obesity, cancer and aging: addressing controversies, Aging (Albany NY) 4 (2012) 320–329.
[22] R. Roussel, F. Travert, B. Pasquet, et al., Metformin use and mortality among patients with diabetes and atherothrombosis, Arch. Intern Med. 170 (2010) 1892–1899.
[23] R.R. Holman, S.K. Paul, M.A. Bethel, et al., 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes, N. Engl. J. Med. 359 (2008) 1577–1589.
[24] G. Zhou, R. Myers, Y. Li, et al., Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action, J. Clin. Invest 108 (2001) 1167–1174.
[25] N.M. Kalariya, M. Shoeb, N.H. Ansari, et al., Antidiabetic drug metformin suppresses endotoxin-induced uveitis in rats, Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 53 (2012) 3431–3440.
[26] E. Diamanti-Kandarakis, C.D. Christakou, E. Kandaraki, et al., Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome, Eur. J. Endocrinol. 162 (2010) 193–212.
[27] F. Forouzandeh, G. Salazar, N. Patrushev, et al., Metformin beyond diabetes: pleiotropic benefits of metformin in attenuation of atherosclerosis, J. Am. Heart Assoc. 3 (2014).
[28] B. Hyun, S. Shin, A. Lee, et al., Metformin down-regulates TNF-alpha secretion via suppression of scavenger receptors in macrophages, Immune Netw. 13 (2013) 123–132.
[29] N. Nath, M. Khan, M.K. Paintlia, et al., Metformin attenuated the autoimmune disease of the central nervous system in animal models of multiple sclerosis, J. Immunol. 182 (2009) 8005–8014.
[30] K. Tsoyi, H.J. Jang, I.T. Nizamutdinova, et al., Metformin inhibits HMGB1 release in LPS-treated RAW 264.7 cells and increases survival rate of endotoxaemic mice, Br. J. Pharmacol. 162 (2011) 1498–1508.
[31] S.L. Woo, H. Xu, H. Li, et al., Metformin ameliorates hepatic steatosis and inflammation without altering adipose phenotype in diet-induced obesity, PLoS One 9 (2014) e91111.
[32] L. Buldak, K. Labuzek, R.J. Buldak, et al., Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages, Pharmacol. Rep. 66 (2014) 418–429.
[33] D. Sag, D. Carling, R.D. Stout, et al., Adenosine 5′-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype, J. Immunol. 181 (2008) 8633–8641.
[34] I. Pernicova, M. Korbonits, Metformin–mode of action and clinical implications for diabetes and cancer, Nat. Rev. Endocrinol. 10 (2014) 143–156.
[35] H. Wang, E. Hertlein, N. Bakkar, et al., NF-kappaB regulation of YY1 inhibits skeletal myogenesis through transcriptional silencing of myofibrillar genes, Mol. Cell. Biol. 27 (2007) 4374–4387.

NICOLAE SIMIONESCU

ARHITECTUL ȘCOLII ROMÂNEȘTI
DE BIOLOGIE CELULARĂ



NICOLAE SIMIONESCU

ARHITECTUL ȘCOLII ROMÂNEȘTI DE BIOLOGIE CELULARĂ

Ion Longin Popescu
editor coordonator

Fundația Națională pentru Știință și Artă
București / 2025

Imagini și texte
selectate din
arhiva personală
de
Maya Simionescu și Ileana Mânduțeanu

Coperta
Raluca Simionescu

Machetare / prelucrare imagini
Anna Mária Orbán

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale a României
SIMIONESCU, NICOLAE
Arhitectul *Școlii Românești de Biologie Celulară* / - Bucureşti:
Fundația Națională pentru Știință și Artă, 2024

ISBN 978 606 555 345 3

CUPRINS

PREFAȚĂ – Prof. Leonida Gherasim, MO Academia Română / 13

ARGUMENT- Ion Longin Popescu / 17

DATE BIOGRAFICE / 20

PAGINI DE DEMULT - DOCTORUL DE PĂPUȘI / 23

COPILĂRIA / 23

ANII DE LICEU...

Ne povestește colegul de școală Paul Georgescu / 26

STUDENȚIE / 30

TÂNĂRUL DOCTOR / 31

INSTITUTUL DE ENDOCRINOLOGIE / 32

„Dragă Simionescu, nu te vrea partidul…”- Ștefan Milcu / 32
Întâlnirea cu Prof. G. Palade / 36

PERIOADA AMERICANĂ / 38

Între Palade și Gunter Barr / 38
Universitatea Rockefeller – o scenă a permanentei căutări / 40
Universitatea Yale – Profesorul / 45
Premii și Distincții / 48
”Invited Speaker”/Președinte / membru in comitetul de organizare la Congrese Internaționale / 49
Consultant al unor instituții științifice, membru în colegii editoriale și societăți științifice internaționale / 49

O VIZIUNE LUMINOASĂ: OPERA LUI NICOLAE SIMIONESCU

Înființarea Institutului de Biologie și Patologie Celulară / 51
Ca un scut în calea sistemului / 51
Engleza, Emigrantul și Dolarii / 53
IBPC-”al 51-lea Stat al SUA” – Glenn Schwaitzer / 56
Un pionier al… Estului Sălbatic / 57
Simionescu și Arta Soluțiilor / 58
Al doilea… unicat: Biobaza / 61
Supărarea securistului Manea și a tovarășei de la partid / 62

Contribuțiile științifice ale lui Nicolae și ale Mayei Simionescu definite de marele lor mentor, George Emil Palade și de marele savant și prieten american, Guido Majno / 65

Profesor George Palade / 65

Noi trasori / 65

Recunoașterea mondială / 67

Contribuții generale la literatura științifică / 67

Cercetarea în ateroscleroză / 68

La Columbia College of Physicians and Surgeons / 68

IBPC după 1989 / 68

Academia Română / 69

Profesor Guido Majno / 69

CA O FLACARĂ ÎN VIAȚA CETĂȚII – SOCIETATEA NAȚIONALĂ DE BIOLOGIE CELULARĂ (SNBC), SAU RENUNȚAREA LA ”IMUNITATE” / 71

Departe de limba de lemn a vremii / 72

Cuvânt Nicolae Simionescu la Sesiunile SNBC:

1982 - Sesiunea de Inaugurare – București / 73

1985 - Târgu Mureș / 73

1986 - Craiova / 73

1989 - Constanța / 74

1994 - Constanța / 74

1989 - Iunie - Cuvântul Prof. Nicolae Simionescu la Simpozionul „Mihai Eminescu – Un secol de nemurire”: comemorarea în IBPC a 100 de ani de la moartea lui Mihai Eminescu. Răspuns la întrebarea unui lider de Sindicat ”ce rost are” comemorarea lui Eminescu la un institut de cercetare? / 75

ACADEMIA ROMÂNĂ - PROPUNERI DE REFORMĂ A CERCETĂRII / 80

Managementul General / 80

Sistemul Instituțional / 81

Un nou sistem de Finanțare; introducerea granturilor competitive / 82

Resursele Umane / 83

Cooperarea Internațională / 83

EXTRAORDINARUL DE FIECARE ZI – EVOCĂRI – UN POSIBIL PREMIU NOBEL / 84

ELOGII – AMINTIRI – OMAGIU / 86

Maya Simionescu, **– soție:** Nicolae Simionescu: prin propriile cuvinte... prin cuvintele contemporanilor...

I. Nicolae Simionescu: Omul / 87

II. Nicolae Simionescu: Ctitorul Geneza Institutului de Biologie şi Patologie Celulară povestită de Nicolae Simionescu / 89

III. Nicolae Simionescu: Fondatorul Societăţii Naționale de Biologie Celulară / 94

IV. Nicolae Simionescu : Cercetătorul – Profesorul / 96

V. Nicolae Simionescu : Membru al Academiei Române (1990) Vicepreşedinte (1994-1995) / 99

VI. Nicolae Simionescu: Romanticul Gânditor / 101

Vlad Simionescu, fiu: O poveste... chinezească / 102

Dan Simionescu, fiu: Grațiosul prim violonist al științei / 105

Adriana Simionescu, nepoata: DADDY / 107

George E. Palade: Nicolae Simionescu - O viziune exigentă, dar luminoasă, pentru viitorul Ştiinţelor Biomedicale în România / 114

Educaţia

Începuturile activității de cercetare

Perioada Rockefeller

Studiul endoteliului continuu

Descoperirea canalelor transendoteliale

Perioada Universității Yale

Un nou institut în Bucureşti

Microdomenii diferenţiate

În loc de concluzii

Guido Majno
Nicolae Simionescu a fost un cetăţean al planetei, dar el a fost în primul rând Român prin toată fiinţa sa, până la ultima sa celulă / 121

Nicolae Cajal
Nicolae Simionescu este și va continua să fie cu noi
(”Academica”, ian. 1996) / 124

Ion Juvara -August 1983 / 126

Ștefan Milcu - (1980/1996) / 127

Constantin Popa
Întâlnirea mea cu Profesorul Nicolae Simionescu
(”Academica”, ian. 1996) / 128

Gheorghe Benga
O dăruire fără margini – UMF Cluj-Napoca
(”Academica”, ian. 1996) / 136

Ștefan Șandor
Mereu viu, printre noi Ștefan Șandor – Universitatea din Timișoara
(”Academica”, ian. 1996) / 137

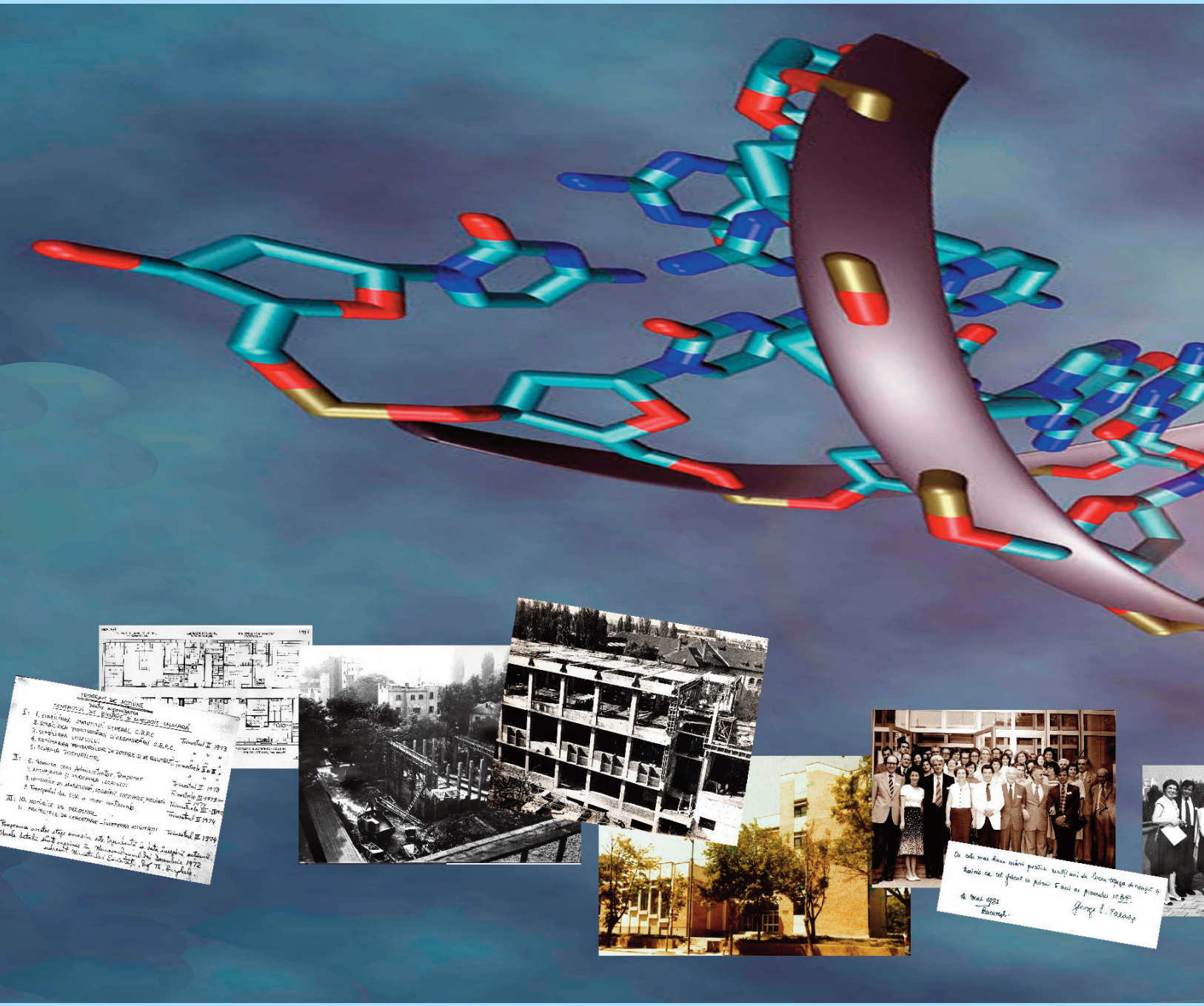
Radu Deac
Un creator de instituții – UMF Târgu Mureș
(”Academica”, ian. 1996) / 139

Andrei Sulica
Acad. Nicolae Simionescu – promotorul reformei cercetării științifice. Introducerea Sistemului de Granturi competitive pentru prima oară în România – în Academia Română
(”Academica”, ian. 1996) / 140

POEZII Nicolae Simionescu (selecție) / 144

Curriculum Vitae - Nicolae Simionescu / 156

ALBUM DE FOTOGRAFII / 167



PREFAȚĂ

Publicarea unui volum de Evocări, Amintiri, Elogii și despre viața și activitatea Acad. Nicolae Simionescu – mare personalitate medicală românească și internațională – reprezintă un eveniment foarte binevenit pentru viața științifică și culturală din țara noastră.

Acad. Nicolae Simionescu, prin activitatea sa complexă de Profesor, Cercetător și Creator de Instituții, se înscrie în lista Marilor Români care fac parte din patrimoniul medical național și mondial: Victor Babeș, Gheorghe Marinescu, Daniel Danielopolu, George Emil Palade – premiul Nobel pentru Biologie și Medicină.

Despre viața și activitatea sa scriu în prezentul volum, cu sensibilitate și înțelepciune, personalități de vârf ale biologiei celulare din SUA și Europa, personalități de prim rang ale vieții științifice naționale, colegi de cercetare și prieteni și, nu în ultimul rând, Familia, totdeauna motorul vieții. Sunt memorabile paginile scrise de George Emil Palade, care i-a fost mentor în activitatea științifică și care subliniază calitatea excepțională de cercetător original și exigent. Colaborarea cu Nicolae Simionescu și Maya Simionescu a adus progrese importante în biologia celulară. Acad. Ștefan Milcu, Acad. Nicolae Cajal, Acad. Theodor Burghele, Prof. Dr. I. Juvara aduc mărturii în cuvinte alese asupra medicului și cercetătorului de vocație Nicolae Simionescu.

În volumul actual, paginile de jurnal ale lui Nicolae Simionescu descriu în cuvinte simple și pline de înțeles perioada de vis și lupta de aproape 20 de ani de a gândi, organiza și dezvolta un Institut de Cercetare Biomedicală în România. Acad. Maya Simionescu, șotie și colaborator, zilnic în laborator și cercetare, evocă în cuvinte sensibile Omul Nicolae Simionescu și domeniile în care prin activitatea sa vastă rămâne mereu prezent în viața științifică românească.

Am fost într-un fel contemporan cu Nicolae Simionescu și de multe ori viețile noastre s-au intersectat. Astfel, am cunoscut Omul și enormele sale resurse și calități. Numele de Nicolae Simionescu l-am auzit prima dată în sălile de Anatomie de la subsolul Facultății de Medicină București, unde eram în toamna anului 1947 student-boboc al Facultății. Studenții anului I erau repartizați pentru lucrările practice de anatomie în săli conduse de un cadru didactic cu titlul de Conferențiar sau Șef de Lucrări. Studenții își schimbau părerile asupra dificultăților întâlnite în studiul anatomiei și disecției și a posibilităților de a le depăși. Mai mulți colegi mi-au spus că la sala 3 era o persoană foarte tânără șef de sală, cu mare talent didactic, apropiat de studenți. Colegii din sălile 1 și 2 mergeau în timpul programului pentru a audia prelegerile și explicațiile întotdeauna clare și ușor de înțeles. Împreună cu câțiva colegi, am mers de numeroase ori la lucrările din sala 3. Am fost impresionat de tânărul universitar – student în anul IV-, preparator universitar Nicolae Simionescu, căruia Prof. Dr. Gr. T. Popa îi încredințase o activitate didactică de grad înalt. Profesorul Gr. T. Popa a recunoscut inteligența, sârguința și activitatea didactică a viitorului Profesor Nicolae Simionescu.

În anii care au trecut repede, înainte de 1970, am obținut informații despre activitatea medicală a lui Nicolae Simionescu. A fost prezent ca asistent, șef de lucrări și conferențiar la Anatomie la Facultatea de Medicină și a lucrat în același timp în echipa chirurgicală a Profesorului I. Juvara. Din 1957 a trecut în cercetare, ulterior șef al laboratorului Morfopatologie al Institutului de Endocrinologie C.I. Parhon. A renunțat la activitatea didactică în care excela prin cunoștințe și talent pentru activitate exclusivă de laborator de morfopatologie, mai aproape de misterele celulei umane. În noul domeniu de activitate a excelat prin lucrări de cercetare de mare valoare publicate în țară și străinătate. A obținut sprijinul Profesorului George Emil Palade și recomandările Profesorului I. Juvara, Acad. Ștefan Milcu și Acad. Th. Burghele pentru o bursă de cercetare în SUA. A urmat o activitate strălucită de cercetare a familiei Nicolae și Maya Simionescu la Rockefeller Institute, Yale University și Colombia College. În universități și centre de cercetare, Nicolae și Maya Simionescu au descoperit laboratoare de vis, teme de cercetare originale, activitate necontrolata de orar, mediu în care a putut lucra și visa. Succesele au venit repede, încât după 1974 ambii au devenit profesori de biologie celulară și cercetători experimentați, cunoscuți în mediul științific internațional.

După 1974 l-am reîntâlnit pe Nicolae Simionescu la Ministerul Învățământului, unde se discuta planul unui Institut de Cercetare Biomedicală. L-am perceput ca o personalitate complexa și deschisă, prezentând în amănunt planul viitorului Institut, detaliile laboratoarelor, instrumentele de cercetare necesare, selecția viitorilor cercetători. Apărea ca o personalitate hotărâtă și echilibrată, cu dorința de a iniția noi direcții în cercetarea și în viața universitară. I-am apreciat hotărârea de a crea în România în orice împrejurări Instituții de Cercetare model, asemănătoare Institutelor de mare excelență din SUA.

Ne-am apreciat reciproc prin idei și simpatii. Am fost fericit în anul 1979 să particip la inaugurarea Institutului de Biologie și Patologie Celulară. Prezenți la acest eveniment, George Emil Palade și mari personalități din Europa și SUA au dat strălucire momentului. Viața științifică din Institut a progresat din 1975, în ciuda condițiilor materiale dure. Participarea mea relativ frecventă la ședințele științifice ale Institutului mi-a permis o mai bună cunoaștere a lui Nicolae Simionescu: spiritul, rigoarea, sensibilitatea și hotărârea de activitate de cercetare și organizare.

După 1989, întâlnirile cu Nicolae Simionescu au devenit frecvente; discutam despre direcții de dezvoltare în învățământul universitar medical, despre oameni și valoarea lor științifică, despre Institute și locul lor potrivit în universitate.

Pentru viața medicală și universitară, pentru cercetarea din țara noastră, viața și activitatea Acad. N. Simionescu reprezintă un exemplu strălucit de urmat. A fost un cercetător de vocație, muncitor, pasionat și original. A lăsat în urmă o operă științifică în care celula endotelială, structura și funcțiile sale sunt esențiale în procesul de aterogeneza și în patologia cardiovasculară.

A creat Institutul, pregătind în același timp tineri cercetători – în țară și în străinătate, precum și structura și tehnicile de cercetare. A definit obiectivele de cercetare, rolul echipei multidisciplinare, premise pentru succesul cercetării. Acad. N. Simionescu s-a dovedit a fi un organizator desăvârșit, Institutul și activitatea lui și a șotiei lui au impulsionat introducerea disciplinei de biologie celulară în Universități de Medicină, ulterior înființarea și activitatea Societății Române de Biologie Celulară în țara noastră.

În prezent, sunt implicați în cercetare și învățământ în domeniul Biologiei Celulare peste 400 de persoane: medici, chimiști, biologi, fizicieni.

Viața și activitatea Acad. N. Simionescu sunt legate de conceptul de Profesor și Școală. A fost întotdeauna un Elev dornic de a ști cât mai mult și ca Profesor dornic de a transmite cunoștințe și experiență. Cunoscându-i în mare parte viața și activitatea lui Nicolae Simionescu, creionez și admir Omul. A fost un mare intelectual, exemplu de responsabilitate, determinare, exigență, modestie și sensibilitate. Titlurile academice, premiile naționale și internaționale, notorietatea în mediile științifice nu l-au schimbat – a rămas o personalitate luminoasă greu de egalat.

Volumul de față acoperă în relativ puține pagini mărturiile contemporanilor privind spiritul, activitatea și realizările unui mare Universitar și Cercetător.

Prof. Dr. L. Gherasim
Membru de onoare al Academiei Române.

ARGUMENT

Nicolae Simionescu - un patriot de Premiul Nobel

S-a vorbit mult, după Decembrie 1989, despre oamenii de cultură, literații și artiștii care s-au opus regimului de dictatură, implacabilei cenzuri comuniste. S-a spus că menținerea Uniunilor de Creație, apariția unor poeți, prozatori, pictori și muzicieni de mare valoare, precum și editarea unor opere de referință au deschis calea unei opoziții subtile, dar eficiente: opoziția sau rezistența prin cultură. Cu toate că produsele literare, muzicale și plastice ”de sertar” nu s-au dovedit nici prea numeroase, nici semnificative ca valoare artistică, un lucru ni se transmite azi cu destulă claritate: cultura, în toate formele ei de manifestare la vedere, a împiedicat izolarea totală a României de restul lumii civilizate.

Dar această acțiune de autoprotecție a spiritului românesc nu s-a sprijinit, cum s-ar crede, numai pe cultură. A fost prinsă în joc, însă cu mai puțină priză la publicul larg, și știința. ***Rezistența prin știință*** - iată o sintagmă despre care s-a scris mai puțin în anii din urmă, tocmai din cauza sistemului închis și poate prea elitist în care prinde viață faptul științific.

Nici aberațiile staliniste din anii ‘50, nici obstacolele financiare și de așa–zisă doctrină puse în calea științei de regimul ceaușist, cu toate infiltrările de impostură cunoscute, nu au redus definitiv la tăcere ceea ce avea, din fericire, adânci rădăcini într-o falnică tradiție. Izolate de lume, lipsite de materiale, reactivi și literatură de specialitate, universitățile și laboratoarele au fost în cele din urmă obligate să se întoarcă la clasici și, cu gura de ozon găsită, să supraviețuiască și chiar să susțină cercetări și invenții remarcabile.

Un caz aparte, excepția care confirmă ideea rezistenței prin știință în fața ignoranței instituționalizate, este Institutul de Biologie și Patologie Celulară din București. Iar orice savant biolog din țară și din lume, când spune IBPC, spune, de fapt, Nicolae Simionescu și Maya Simionescu, secondați de peste 100 de profesioniști ai cercetării fundamentale.

Publicul cititor se va întreba, poate, cine a fost Nicolae Simionescu. Pentru a răspunde la această întrebare, nu ne ajung câteva fraze și nici chiar paginile unei publicații. Abia dacă ne ajunge, pe moment, o carte.

Această carte în care se va vedea că Nicolae Simionescu a plecat de curând dintre noi, iar viața lui a fost de o intensitate puțin obișnuită, ca o flacără de magneziu. A fost un savant al inimii, dar niciodată al propriei sale inimi. Romantic prin destin, clasic prin rigoare și caracter, chirurg, endocrinolog, biolog, profesor universitar, manager, academician.

Așa cum poetul, privind intens iarba, a devenit ”doctor în iarbă”, Nicolae Simionescu, privind zeci de ani celulele corpului uman, a devenit doctor în biologia celulară. Prin crearea unui Institut care să nu aibă alt scop decât să studieze organizarea corpului, a inimii și a plămânilor, acest savant al ”subtilității extreme” a introdus, practic, îndărătul Cortinei de Fier și chiar dincolo de Cortina Ceaușistă de Plumb, Calul Troian al Gândirii Libere. În granițele strâmte ale cazărmii în care-și târa viața o țară întreagă, Simionești, venind din America pe calul alb al determinării și optimismului, au adus pe malurile Dâmboviței o ”lume pe dos”: lumea normalității.

Ceva l-a ”mânat în luptă”, ceva l-a împins să-și ia mereu bilet dus-întors. Pe când majoritatea celor care călătoreau în străinătate ”uitau”, pe bună dreptate, să se întoarcă, el punea la cargo sute de kilograme de substanțe și aparate scumpe și împreună cu soția pășea senin în zona închiriată de TAROM a aeroportului Kennedy. Venea la ”institutul lui”, la visul împlinit al tinereții. A renunțat la California, la un salariu, împreună cu soția, de circa 42.000 de dolari pe lună (!) și a venit la un venit familial de 8-9 mii de lei lunar. De la libertatea absolută și onorurile de mare profesor și colaborator apropiat al premiantului Nobel George Emil Palade, a ales să trăiască sub permanenta curbă de sacrificiu a unui regim clădit contra naturii.

Pe care l-a sfidat și pe care l-a învins. IBPC a fost mulți ani la rând o cetate inexpugnabilă, al cărui statut s-a impus prin marea personalitate a creatorului său. Care alt institut din lumea comunistă a obținut performanța de a primi finanțare anuală de la guvernul american? Unde s-a mai pomenit, în acei ani, să vină crema cercetării din Statele Unite și, în decursul a 4 simpozioane, să declare că americanii au avut mai multe de învățat de la români decât românii de la americani?

Pentru un timp, IBPC a fost singurul Institut de profil din lume, dat fiind că în SUA cercetările se desfășurau în universități. Studiile avansate de Simionescu au dat speranțe lumii medicale. El făcuse descoperiri în privința vaselor de sânge, a endoteliului – un mare pas către ziua în care ateroscleroza va putea fi pusă sub control. Mai avea nevoie de câțiva ani și rezultatele descoperirilor sale i-ar fi adus, după opinia multora dintre colegii săi, Premiul Nobel.

Din nefericire, Nicolae Simionescu a murit la 6 februarie 1995, chiar în urma uni atac de cord; a fost ”răpus cu blândețe” (G. E. Palade) de boala pentru studiul căreia și-a dedicat o mare parte din viață.

”Zgomotul de fond” (G. E. Palade) ce însoțea activitățile lui zilnice a fost înlocuit de tăcere, dar cu toate acestea, în institut se lucrează.

Maya Simionescu și colaboratorii duc înainte testamentul marelui român patriot care a demonstrat că știința adevărată și ”munca de sclav” (Brâncuși) pot învinge chiar și un sistem politic malign.

Un singur amănunt, dureros, deosebește IBPC-ul de azi de cel de acum câțiva ani: în holul central a fost dezvelit un bust, iar pe frontispiciul clădirii, cineva, parcă lipsit de convingere, a adăugat un nume în ghilimele: ”Nicolae Simionescu”. Și azi, foștii lui colegi refuză să ridice privirea spre placa respectivă. Ei tot mai speră ”fără speranță” că, eventual, s-a făcut o eroare în listele lui Dumnezeu.

Cartea de față vine să arate de ce a fost iubit atât de mult acest om.

Ion Longin Popescu

DATE BIOGRAFICE

Nicolae Simionescu s-a născut la 27 iunie 1926, în familia unui mic negustor din cartierul Tei. A absolvit Liceul ”Sf. Andrei” în 1944 și Facultatea de Medicină cu Diploma de Merit în 1950. Obține titlul de Doctor în Științe Medicale în 1966.

Încă de pe băncile facultății, marele anatomist Gr. T. Popa l-a remarcat și l-a invitat la Catedra de Anatomie, unde i-a propus să lucreze ca preparator. Va rămâne aici până în 1957, parcurgând toate treptele ierarhice universitare permise de sistemul de învățământ din acea vreme.

În paralel, va lucra, tot ca preparator, la Clinica de Chirurgie a profesorului Ion (Cuti) Juvara. Deși George Emil Palade crede că această perioadă nu a lăsat ”urme majore” în biografia lui Nicolae Smionescu, exceptând o serie de ”aventuri și pozne”, Acad. Maya Simionescu spune că întreaga activitate științifică a soțului său a fost benefic influențată de specializarea sa în chirurgie.

Înzestrat cu o capacitate de muncă neobișnuită, cu perseverență, imaginație și spirit de inițiativă” (Acad. N. Cajal), Simionescu se va muta la Institutul de Endocrinologie din București, condus de Acad. Ștefan Milcu. În această perioadă, curiozitatea lui înnăscută s-a concentrat pe câteva subiecte bine alese, rezultatele constând în elaborarea unor importante cursuri universitare și a unor publicații științifice și monografii. Au fost remarcate îndeosebi lucrările asupra glandei suprarenale și o monografie publicată în Anglia asupra morfologiei normale și patologice a glandei tiroide. Dintre cele peste 300 de lucrări publicate înainte de 1970 – anul plecării în Statele Unite, a fost deosebit de bine primită monografia dedicată ”Histogenezei cancerului tiroidian”, editată concomitent în Anglia și SUA. La Institutul de Endocrinologie, Simionescu a întâlnit-o pe Maya Scherzer, o remarcabilă tânără cercetătoare care i-a devenit colaboratoare.

În 1976, îi este conferit Premiul ”Gh. Marinescu” al Academiei Române pentru cercetările de avangardă dedicate cancerului tiroidian. Această încununare timpurie a meritelor sale științifice îi va spori prestigiul în rândul endocrinologilor din Europa și SUA. Ca urmare, va fi invitat de Uniunea Internațională împotriva Cancerului ca expert la Institutul ”Jules Bordet” din Bruxelles. Tot ca expert în cancerul tiroidian va fi invitat de

Institutul ”Gustave Roussy” din Paris și de ”National Institute of Health” din Bethesda, SUA.

Deceniul 1965-1975 va aduce României o temporară libertate a sistemului bazat pe ideologia unică: un anume pragmatism tindea să cuprindă structurile politice, revărsând o oarecare bunăstare și calm în societate. Au fost anii deschiderii controlate spre Vest, care, dacă ar fi continuat, s-ar fi ajuns ca atât România, cât și dictatorul ei suprem, să aibă azi o cu totul altă soartă. Iar pe locul în care ”cresc” acum 800 de cruci albe de eroi tineri și copii, s-ar înălța, poate, un Institut de cercetări. Savantul George Emil Palade descrie admirabil această perioadă, în care Nicolae Simionescu ”își va schimba destinul” părăsind endocrinologia pentru a forța primele frontiere într-o altă știință, inexistentă pe atunci în țara noastră: Biologia Celulară.

În 1966, își amintește G. E. Palade, ” după mai mult de 20 de ani de la plecarea mea din România, m-am întors în țara mea de origine ca membru al unei delegații a Academiei Naționale de Științe a Statelor Unite, pentru a negocia o înțelegere de schimburi științifice cu Academia Română. În această perioadă, guvernul comunist al României încerca să obțină o margine de independență față de Uniunea Sovietică prin deschiderea unor ferestre către Vest. Viața era încă grea în România, dar cel puțin era evident că la orice nivel, de la oficialitățile guvernamentale, la profesorii universitari și până la cetățenii de rând, că românii erau hotărâți să-și afirme și să-și apere identitatea națională, fiind pregătiți să recunoască existența unor gradiente economice și științifice și să încerce să stabilească contacte cu lumea, dincolo de considerațiile doctrinelor politice”.

Atunci a hotărât G. E. Palade să invite un cercetător român tânăr să lucreze în laboratorul de biologie celulară al Universității Rockefeller. El își amintește: ”Îl cunoșteam pe Nicolae Simionescu din perioada studenției și i-am cerut un sfat vechiului meu prieten și coleg de clasă, Ion (Cuti) Juvara; răspunsul fiind entuziast, l-am invitat pe Nicolae Simionescu să vină la Universitatea Rockefeller. El a acceptat fără întârziere, cu toate că postul pe care-l puteam oferi – asistent de cercetare, era cu câteva trepte sub poziția de conferențiar pe care o avea la București”. În laboratorul lui Palade, descris recent ca ”leagănul biologiei celulare moderne”, Nicolae Simionescu s-a alăturat generației lui Günter Blobel, David Sabatini, Marilyn Farquhar și James Jamieson, actualii conducători ai biologiei celulare americane. El li s-a alăturat, spune Palade, ”cu ușurință și grație”, chiar dacă aceștia aveau, la început, dificultăți la pronunțarea numelui său.

Perioada Americană s-a prelungit de la un an la zece, lui Nicolae Simionescu alăturându-i-se, cu întârziere de șase luni, soția sa, Maya. A

fost, desigur, mult de luptat cu autoritățile comuniste pentru a le convinge să elibereze un pașaport și pentru doamna Simionescu. Același geniu bun, G. E. Palade, a condus ”ostilitățile”. Își amintește: ”Lucrul (pentru cercetarea endoteliului vascular – n.n.) a demarat prompt și a progresat repede, dar există totuși un element care afecta dureros situația generală. Maya Simionescu era încă în București.

O serie de cereri insistente au reușit, în final, să o aducă la Universitatea Rockefeller, fapt ce a însemnat fericire. Nicolae și Maya s-au instalat în campusul universitar și munceau febril zi și noapte, pentru a face față competiției formidabile din domeniul nostru de cercetare”.

Încă din 1970, Nicolae și Maya Simionescu au decis că în România trebuie și poate fi realizat un Institut de biologie celulară. În 1979, în urma unei finanțări nesperate din partea guvernului român, clădirea IBPC a fost inaugurată. În jurul celor doi s-au strâns cei mai talentați tineri cercetători ai momentului, selectați în urma unor teste riguroase. Unii dintre ei fuseseră deja la specializare în Statele Unite, ca rezultat al intervenției profesorilor Simionescu și Palade.

Entuziasmul tuturor avea o direcție, dar fiecare pas înainte trebuia să despice valuri de întuneric și frontiere nedefinite. O cursă fără sfârșit, în care se pornea, vorba poetului, ”cu Dumnezeu la cot”, care nu oferea niciun indiciu privind obstacolele de pe traseu.

Prof. Simionescu își avertizase, de fapt, echipa:”În viitorul apropiat știm înspre ce ne îndreptăm, dar nu știm ce vom găsi. Am elaborat planuri, dar nu și predicții, pentru că, în realitate, dacă lucrurile ce vor fi găsite vor fi într-adevăr noi, ele sunt prin definiție necunoscute azi. Suntem tonifiați de fiecare informație nouă, în același timp fericiți că suntem atât de ignoranți, încât să facă din fiecare zi când reintrăm în laborator o confruntare cu propriul nostru intelect”.

Pagini de demult

DOCTORUL DE PĂPUȘI

– ne povestește Dna Cornelia Constantinescu –

Copilăria. Se cunosc puține date din copilăria și tinerețea savantului Nicolae Simionescu. Nu și-a dorit niciodată publicitate, s-a ferit de interviuri și de dezvăluiri personale. A socotit, poate printr-un exces de decență, că singurul lucru care contează este ceea ce faci pentru societate. Nu a făcut niciodată asocieri între realizările sale științifice și date din biografia sa. Cei care l-au cunoscut îndeaproape spun că avea o mare pudoare când urma să vorbească despre sine sau când era nevoit să-și dezvăluie meritele în public. În același spirit și-a crescut și băieții, Vlad și Dan, care nu-și amintesc să-l fi auzit de prea multe ori vorbind despre anii copilăriei sau ai adolescenței. De altfel, un om ca Simionescu, chiar de ar fi dorit să-și istorisească aventurile din Tei, unde a copilărit, n-ar fi avut timp s-o facă.

Dacă anii liceului l-au consacrat ca vedetă ”în inteligență și pozne”, cu inevitabilele chiuluri de la ore și ieșirile la o bere sau la cinematograf, abia studența i-a fost , vorba poetului, ”cimitir al tinereții”. În studenție a început Simionescu să piardă șirul zilelor, al nopților și al weekendurilor. Studența la medicină este în sine o corvoadă suportabilă numai de cei mai ambițioși, dar împrejurarea de a fi în același timp student și preparator la două discipline diferite (Anatomie și Chirurgie, în cazul lui) întrece orice închipuire ”normală”.

Situația s-a păstrat și după terminarea studiilor (un fel de a spune, deoarece acest om nu a terminat niciodată să studieze), încât te întrebi când a avut timp să se însoare și să-și întemeieze o familie. Acest om, fără a fi un extravagant, a avut mai multe costume de haine în viața sa decât duminici libere! Dacă timpului petrecut în țară nu i-a ținut prea strict socoteala, în schimb, în ”perioada americană” găsim că în primii doi ani petrecuți la Universității Rockefeller a ieșit din laborator doar 4 (patru!) duminici.

Căsătorindu-se cu Maya, el nu a intrat, după tipicul comun, ”în rândul lumii”, ”domesticindu-se” și văzându-și de ale casei, ci a înfăptuit ”oficializarea unei sclavii”. Biolog de excepție, cercetătoare împătimită,

care a acceptat să lucreze neplătită un an în cadrul Institutului de Endocrinologie doar pentru a nu pierde contactul cu știința, s-a ”înjugat” de bunăvoie la tipul de robie propus de soțul său. Pentru a avea cât mai multă vreme acces la primul microscop electronic achiziționat de institut (suprasolicitat de toți tinerii cercetători), Simionești dormeau în laborator, trezindu-se că a început o nouă săptămână fără ca ei s-o fi terminat pe cealaltă. Mai târziu, motivându-și alegerea celor doi pentru America, George Palade mărturisea: ”Când v-am văzut prima oară la București, în laboratoarele de endocrinologie, mi-ați făcut impresia că sunteți niște sisifi amândoi și mi s-a părut că-i păcat de voi să nu vi se creeze niște condiții de lucru rezonabile.”

Iată de ce nu a avut niciodată Nicolae Simionescu timp să vorbească despre copilăria sa. Avea de gând s-o facă într-un jurnal memorialistic, ”la bătrânețe”, dar, din nefericire, inima îi obosise prea mult în cei 50 de ani de muncă continuă, istovitoare.

Am avut, totuși, șansa de a intra în posesia unor amintiri datorate unei ”vecine”, doamna Cornelia Constantinescu. Din scurtele sale evocări, adevărate flăcări de magneziu, am putut reconstitui, cu mare îngăduință, primii 16 ani de ”Nicușor” între copiii din Tei.

„M-am născut și am copilărit în strada Șerbănescu Tei nr. 70 (acum Cheile Zănoagei). Părinții mei erau vecini cu familia Simionescu și erau și buni prieteni. Din copilărie îmi amintesc următoarele: Între 5 și 8 ani, ne jucam la mine în curte cu jucăriile, împreună cu Bibi, Steluța, Florica și de multe ori venea și Nicușor. Țipam la el peste gard, enervându-i pe curcanii adormiți la umbra dudului. Noi, fetele, făceam mâncare la păpuși și curățenie în pătuțuri, le schimbam de rochițe și plecam la cumpărături. Luam alimente de la Nicușor, deoarece el era singurul negustor din apropiere, avea prăvălie cu de toate. Uneori ne vindea marfa printre uluci: cochilii de melci pline cu făină, marmeladă pe frunze de corcoduș, frunze de varză, salată, pătrunjel, felii de pâine, mălai, griș, lapte praf. Folosea cântar confecționat din două capace de cutii de cremă de ghete, legate cu o sfoară. Nu ne înșela niciodată, dar nici noi nu cumpăram pe credit, îi dădeam voie, drept răsplată, să ne consulte păpușile, iar dacă vreuna era găsită bolnavă, îi permiteam să-i facă o injecție cu acul de siguranță. Era cel mai fericit când o auzea pe vreuna tușind… Avea spirt, avea vată și vorbea cu ele, asigurându-le că nu doare.

Între 8 și 10 ani,venise timpul să ne jucăm de-a școala. Nicușor era profesorul (niciodată n-a dorit alt rol!), iar noi eram elevele. Ne punea să scriem, să recităm poezii, apoi ne punea note. Era foarte exigent și ne certa ori ne punea în genunchi când greșeam la recitare. De Crăciun, venea la noi și mă ajuta să împodobesc bradul. Găsea întotdeauna locul

cel mai potrivit pentru agățarea globurilor. În jurul pomului, în așteptarea lui Moș Crăciun (nu mai credeam, dar ne simțeam bine să ne imaginăm), jucam tabinet și popa prostu. Alte jocuri, mai ales în timpul verii, erau baba oarba, șotronul, telefonul fără fir (îi plăcea să fie ultimul din lanț, să spună trăsnăi), leapșa pe cocoțate.

De la 10 la 16 ani, mai ales seara, împreună cu Dicuța, Titel, Puiu și alți prieteni, ne jucam de-a v-ați ascunselea. Când ne plictiseam, ieșeam în fața prăvăliei părinților lui Nicușor și încingeam o bâză la care participam și noi, fetele. Câte una începea să plângă de durere, iar Nicușor, mare domn ca întotdeauna, îl certa și-l deconspira pe cel ce lovea prea tare. Ne plăcea foarte mult să jucăm ținta - un joc cu bile colorate pe care trebuia să le ascundem într-o gropiță. Cine arunca cele mai multe câștiga. Dacă se găsea în finală cu vreo fată, Nicușor o lăsa întotdeauna să câștige, aruncând intenționat bilele pe direcție greșită.

Când se lăsa întunericul, să fi văzut fericire pe băieți! Începea jocul *cârpa neagră*. Legau o cârpă neagră, cât mai mototolită, cu o sfoară și o aruncau pe trotuar. Dacă trecea cineva, trăgeau de sfoară și să fi văzut sperietură! Țipau femeile, dar săreau într-o parte chiar și cei mai curajoși bărbați. Noi ne ascundeau în tufele de coacăze, altfel riscam palme la moment.

Câte și mai câte altele… Parcă văd: vara, domnul Simionescu, tatăl lui Nicușor, cumpăra pepeni de la țărani, iar noi ajutam la descărcarea și de multe ori la vânzarea lor. Strigam cât ne ținea gura în cartier: pepeni… pepeni… cine ia de la mine toată vara-i merge bine/ cine ia de la altul toată vara-l doare capul…

Mare bucurie aveam de Paști… Părinții noștri puneau mână de la mână și închiriau un autobuz. Ne urcam cu mic cu mare și porneam spre mănăstire (Pasărea, Țigănești, Cernica, Căldărușani)… Acolo, participam la slujbă și apoi aranjam masa chiar în curte, invitându-i și pe călugări. Țin minte că o dată era ninsoare, dar tot am plecat cu autobuzul, fiindcă toți ai noștri erau foarte religioși. Lui Nicușor îi plăcea să se urce în autobuz pe orice vreme și ne încuraja și pe noi.

Când era ceva mai mic, am uitat să spun că era mereu bolnav din cauza amigdalelor. Lua atunci prontoxil…”

Anii de liceu...
ne povestește colegul de școală, Paul Georgescu

Liceul. De la ”cârpa neagră” de pe trotuar, până la episodul ”Șalăul”, ce se va citi mai jos, saltul pare destul de mare, deși timpul scurs între cele două episoade este destul de scurt. Dotat cu o inteligență cu mult peste media copiilor de vârsta sa, Nicolae Simionescu se maturiza într-un ritm care devenise aproape insuportabil colegilor săi de șotii. În numai doi ani de liceu, prestigiul său o luase înaintea celui al multor profesori, simpla sa prezență pe culoar atrăgând un zâmbet și un afabil răspuns la salut chiar și din partea unui ”zmeu” ca ”Șalău”, directorul adjunct al Liceului ”Cantemir Vodă”. Prin modul original în care-și ”promova” imaginea personalității sale accentuate, se ajunsese ca ”Premiul Trei” la care, parcă, se ”abonase” ”Țrezen” – poreclă dragă tuturor colegilor – să aibă mai multă greutate decât Premiul Întâi și Doi.

Cei mai mulți dintre profesori, ei înșiși mari personalități ale școlii românești interbelice, intuiseră în ”domn Simionescu dintr’a patra” flacăra geniului, pecetea creativității și a originalității. Întotdeauna îmbrăcat elegant (”Cred că a avut pantaloni lungi, cu dungă, încă din clasa întâi”), atras de ”umanioare” (latină, italiană, filozofie, literatură, anatomie), își atrăsese o faimă de seriozitate ce-l plasa ”deasupra” oricărei șotii specifice vieții de liceu. Gândea pozitiv și-și ”supunea” preopinentul puternicei sale voințe, ”fluxului” său bioenergetic. Mai târziu, ar spune un psihanalist, această rarisimă calitate îl va ajuta să impună autorităților comuniste voința sa aproape supraomenească de a construi un institut ”capitalist” chiar sub umbrela celei mai retrograde dictaturi neo-staliniste.

Regăsim, în anii de liceu, și alte trăsături de caracter ce vor face, mai târziu, din Nicolae Simionescu un partener și chiar un model pentru mulți mari savanți ai biologiei celulare. Avea, spre exemplu, un talent extraordinar de a-și organiza timpul. Găsea pentru toate ora potrivită. Citea multă literatură beletristică, frecventa teatrele de zi și noapte, era la curent cu noutățile din Anatomie (nu întâmplător, peste doar câțiva ani, marele anatomist Gr. T. Popa îl va lua preparator la catedra sa). Nu lipsea de la Filarmonică, de la Teatrul Național, de la nicio manifestare modernă sau culturală notabilă. Știa, încă din primii ani de liceu, că va studia Medicina și-și pusese în minte să ajungă un ”doctor mare”. Calea de

mijloc, mediocritatea nu făceau parte din vederile sale de adolescent matur. Dimpotrivă, se considera un luptător, după principiul ”voi privi în iarbă/până voi deveni doctor în iarbă” (Marin Sorescu).

Un fost coleg de liceu, profesor universitar Paul Georgescu, își aduce o contribuție substanțială la schițarea portretului marelui dispărut. Amintirile sale din acea vreme sunt o veritabilă pagină de literatură memorialistică. Dl Paul Georgescu, fost cercetător al Academiei Române, este profesor titular la Universitatea ”Simon Bolivar” din Caracas, Venezuela și profesor onorific la Universitatea ”Mayor de San Andres” din La Paz, Bolivia. Este scriitor și expert în domeniul fluvial.

* * *

„Ne-am cunoscut acum vreo șase decenii, când am început ambii liceul, la ”Cantemir Vodă” din București. Ne-am împrietenit și toate *cele bune* (puținele) și *drăcoveniile* (mai multicele) pe care le-am făcut ne-au apropiat atât de mult, încât nu ne-am fi putut închipui că vreodată Charon ne va trece rând pe rând și separați unii de ceilalți pe cealaltă parte a infernului Laethe. Așa cum l-a condus, cu indecentă grabă – aș zice – pe dragul și neuitatul nostru Țiganu’.

Căci nu importă cât de valoros a fost Acad. Dr. Docent Nicolae Simionescu: pentru noi, el a fost mereu Țiganu’. Nicu sau Nicușor îi zicea domnu’ ”Sile”, tatăl lui, care, deși era numai un ”mic negustor de prin Tei”, l-a stimulat fără întrerupere, ajutându-l astfel să-și clădească meritata încredere în capacitatea și forțele proprii, fapt pe care savantul de mai târziu l-a recunoscut mereu, cu un amor filial inegalabil. Pentru măicuța sa, care ne ”omenea” ori de câte ori îi pășeam pragul casei, el era tot un Nicușor, dar acela după care ea se … ”topea”. Pe scurt, însă – de drept și de fapt – pentru noi colegii și amicii săi, era – și este încă - Tiganu’ și, eventual, Nae, dragi nume prin intermediul cărora îl vom purta și ”*revedea*” mereu, cu multă emoție în sufletele noastre.

Am fost coleg de clasă cu Simionescu Nicolae, cu excepția clasei a șaptea, pe care am fost obligat s-o urmez la ”Spiru Haret”, fiind ”indezirabil” la ”Cantemir”, datorită multiplelor mele abateri de la buna purtare. Aceasta deși ”Conu Alecu”, tatăl meu, nu de puține ori a căutat să mă ”corijeze”, încălcând flagrant multe din drepturile copilului (ale mele), așa cum s-ar zice azi.

Am pomenit cele de mai sus nu pentru a vă face să gândiți – ferească Domnul – că cine se aseamănă se adună, ci pentru a vă ajuta să înțelegeți câte ceva din atmosfera în care am trăit în această minunată etapă a vieții noastre.

Cred că Țiganu' a avut pantaloni lungi, cu dungă, încă din clasa întâia. Era destul de înalt, cu spatele drept care îi dădea un port mândru, frumușel, cu părul negru puțin cârlionțat, și o umbră, o bănuială de mustăcioară – care mai târziu ne-a făcut geloși, căci fetele, de……; și bineînțeles, avea o plăcută tentă a pielii, care i-a definit porecla – nume.

În acea perioadă prima clasă de liceu de prin anul 1937, eram un copil slăbuț și mititel, nu mult mai cuminte ca mai târziu, dar circumstanțial obligat să mă port "salon", căci reușisem primul la "concursul de admitere" și eram monitorul clasei. Ca atare, cu Galia – cel de-al doilea – stăteam în prima bancă – dreapta, în fața catedrei, și prezentam "condica". În mod logic, deci, nu mă putea interesa un coleg care, numindu-se cu S, era la coada catalogului, stătea în ultima bancă – stânga din fundul clasei, la "antipodul" catedrei și, în plus, împărțea pupitrul cu înaltul Pantazapol – denumit "Muzi", pentru vocea lui groasă – și care era… repetentul clasei.

Mi-am schimbat însă curând aceste păreri, căci Simionescu era inteligent, ordonat, desena și scria foarte frumos, și talentat (zicea el) la volei, baschet, fotbal (deprinderi la care eram nul). Cânta în corul liceului, din care fusesem expluzat de Domnu' Marcel din lipsă de ureche (muzică) – iar de sărbători spunea poezii, gândeam eu, cam la fel de bine ca mine, deși nu prea le "vedea" la Domnu' Motomancea, la Matematică.

Surpriza mare ne-a făcut-o însă la sfârșitul anului, când, după mine, Andrei Galia și Dan Fințescu – el a luat premiul al treilea. Noi, primii numiți, ne străduiserăm mult, care pe care, dar se părea că Nae nu făcuse vreun efort special pentru a dobândi "acel detaliu", cum zicea el. Și mai târziu, deși, pentru a mai lua vreun premiu, noi a trebuit să transpirăm din greu, el a continuat să-și ia același aer nonșalant al său (aproape de drept) premiul al treilea sau mențiune. Îmi modificasem, de asemenea, și părerea asupra locului pe care îl ocupa în sala de clasă, căci putea să fie mai bine decât să fii sub ochii răi ai profesorilor.

Din clasa a doua, Nae s-a maturizat și mai mult, era în toate echipele "de minge" ale clasei, recita din Eminescu la toate serbările – ca nimeni altul - se evidenția la română și latină și în continuare nu-i prea păsa de matematică. De fapt, el decisese că se va face medic, drept pentru care "Sile" și "mămica" chiar îi cumpăraseră tratatul "Testut" cu ajutorul căruia Nicușorul lor avea cel mai frumos și complet caiet de "Anatomie".

S-a produs și a trecut "cutremurul mare" din '40, fuseserăm cu toții "străjeri" și unii băieți chiar își exprimaseră simpatiile pentru un partid sau altul, dar acestea pe amicul nostru nu l-au afectat în nicio formă. Citea

mai mult ca noi și fiind mai liberal crescut de către părinții săi, a început să meargă regulat, până și noaptea, la teatru, la piese pentru ”cei mari” și la concerte. Ne-a influențat cu această pasiune și pe unii dintre noi – pe mine, pe ”bază” de Conu’ Alecu, ”numai ziua” – și astfel am devenit amici și mai apropiați.

Ne-am distanțat puțin când Țiganu a ”trecut” la italiană, pe când aproape toți ceilalți aleseserăm germană. Ne-a argumentat însă că pe când noi abia vom bâigui ceva pe nemțește, el va vorbi o italiană cel puțin acceptabilă, pe lângă faptul că va înțelege perfect orice film italian, la mare modă atunci. A avut oarecare dreptate și în plus a fructificat șansa de a-l avea ca profesor de italiană pe fiul lui Perpessicius ce l-a prezentat marelui literat; acesta i-a intuit ”stofa” și l-a stimulat și el pentru a-și dezvolta cultura. Un an sau doi după aceasta, Nae a optat pentru ”modern” – studiile umanistice de astăzi – pe când aproape toți ceilalți din grupul nostru am urmat matematicile, realul.

Eram acum în ”Cursul Superior”. Amicul nostru avea o mustăcioară închisă în toată regula și – numai pentru ”oficialități”, bineînțeles – devenise domnul Simionescu. Mereu îngrijit îmbrăcat, avea o ținută pe care chiar cu ochii minții de azi o revăd ca fiind remarcabilă pentru un elev de liceu, iar prestigiul său în școală era de-a dreptul demn de invidiat. Nu era mai ”bun” ca noi ceilalți, ce eram care mai de care mai ”rău” – căci cot la cot făceam toate șotiile inerente vârstei, dar, cu faima de seriozitate dobândită, el era considerat… deasupra acelor abateri.

Îmi amintesc, în acest sens, că într-o bună zi ”chiuleam” cu el de la o oră ”plicticoasă”, de la nu mai știu ce materie. Mergeam cu pași ușori pe coridorul de la etajul întâi al liceului și ne îndreptam spre scara ce ducea spre sala de gimnastică. Când, pe neașteptate, subdirectorul Malin, ”șalăul” cum era poreclit, apare la vreo 10 metri în fața noastră.

”Țigane…” șoptesc eu, ”ce îi spunem?”. Imperturbabil, Nae îmi face semn cu mâna să rămân în urma lui, schițează scurt un salut și… o ia repejor înainte. Profesorul Malin, oarecum descumpănit, îi șoptește cu ochii ”trecerea” și îi zice:”Bună ziua, domnu’ Simionescu.” Iar pe mine, care desigur eram destul de fâstâcit, mă întreabă suspicios:”Și tu ce cauți pe aici, Georgescu?!”Fără măcar să se întoarcă, ”protectorul” meu, tot din mers, răspunde:”E cu mine!”La care ”șalăul”, îmblânzit, însă cu vădită părere de rău, mustăcește:”… bine… de data asta… scăpași…”

Este inutil să spun că episodul, înflorit cu toate detaliile și însoțit de hohote de râs homeric, a făcut ocolul liceului, iar prestigiul lui Nae a depășit înălțimea norilor. Am dat bacalaureatul, Țiganul s-a dus la ”Medicină” pe care și-o dorise atât de mult, iar eu am intrat la ”Școala

Politehnică". În mod natural, ne vedeam mai rar, dar continuam să vorbim destul de des la telefon și în scurte vacanțe, mergeam uneori pe munte. Nae era mereu printre marii amatori, dar nu de puține ori se retrăgea discret din activitățile generale, pentru a studia o carte sau un articol de specialitate, sau pentru a completa o referință bibliografică.

Ah! Era să uit. Într-o zi, în primul an de facultate, a fost nevoie să-mi se facă niște injecții cu un antibiotic. Îl sun pe Nae, care zice că are treabă, dar că va veni. Sosește cu un aer grăbit, nervos, își scoate haina, se spală pe mâini, ia mii de precauții și mă "înțeapă". Îi mulțumesc și gentil, el se oferă să vină a doua zi. La ora fixată îmi face injecția în doi timpi și trei mișcări, fără ca măcar să-și scoată impermeabilul, căci afară ploua. Nu m-a lăsat inima să-l iert și am subliniat că în sfârșit are, și el două injecții reale, nu de recuzită, la activul său. Am râs cu poftă amândoi, dar el, "precum îi era felul", a adăugat: Recunoaște, totuși, Pușțiule, că azi m-am purtat ca un doctor mare.

Peste câtva timp, m-a prezentat inegalabilei lui Maya, care atâția ani a colaborat cu el, cu atât amor și atât de fructuos. Apoi, pentru că așa a fost să fie, fiecare pe contul său, am "fugit" din țară, fără a mai ști unul de celălalt. Am aflat însă indirect de întoarcerea lor și de condițiile pe care el le-a impus autorităților și, fără a cunoaște multe detalii, sunt sigur că nimeni altul în afară de el nu le-ar fi putut obține.

L-am văzut prin '93, când am revenit în țară. Împreună cu "Țuțu" Budeanu, "Dody" Sfințescu și "Bivolul" Constantinescu l-am vizitat la Institutul său, după care – la el acasă – am depănat unele din multele noastre amintiri, toate vesele, însă umbrite acum de informațiile recente, pe care le aveam despre unii dintre cei ce nu mai puteau fi de față. Maya, ca o discretă și bună soție, ne pregătise gustarea de rigoare, dar ne lăsase singuri, căci acum eram din nou băieții de prin anii '40. Până la separarea ireparabilă ce a survenit acum doi ani, am mai vorbit la telefon, ne-am văzut sporadic în câteva ocazii, și ne-am scris felicitări de Crăciun și Anul Nou.

Îmi pare rău că nu am putut să i-o citesc și pe ultima. În aceasta, referindu-mă în glumă la el ca la un "doctor mare", făceam observația că ar fi normal să-l văd "nobelizat", căci, de curând, realizasem că în privirea lui există o scânteie interioară specială, asemănătoare aceleia din ochii lui Albert Einstein, a cărui fotografie anexasem la urările mele de bine. "Da, dragul meu, ai fost un doctor mare de tot și nu am crezut că ar fi posibil să pleci vreodată dintre noi. Poate, cu voia Domnului, ne vom revedea, ca să… mai facem vreo șotie".

Studenție. A absolvit Facultatea de Medicină cu Diploma de Merit în 1950. Obține titlul de Doctor în Științe Medicale în 1966. Încă de pe băncile facultății, marele anatomist Gr. T. Popa l-a remarcat și l-a invitat la Catedra de Anatomie, unde i-a propus să lucreze ca preparator. Va rămâne aici până în 1957, parcurgând toate treptele ierarhice universitare permise de sistemul de învățământ din acea vreme.

Tânărul Doctor. Lucrează, atât la Catedra de Anatomie, cât și ca preparator la Clinica de Chirurgie a profesorului Ion (Cuti) Juvara. Maya Simionescu spune că întreaga activitate științifică a soțului său a fost benefic influențată de specializarea sa în chirurgie.

Înzestrat cu o capacitate de muncă neobișnuită, cu perseverență, imaginație și spirit de inițiativă" (Acad. N. Cajal), Simionescu se va muta la Institutul de Endocrinologie din București, condus de Acad. Ștefan Milcu. În această perioadă, curiozitatea lui înnăscută s-a concentrat pe câteva subiecte bine alese, rezultatele constând în elaborarea unor importante cursuri universitare și a unor publicații științifice și monografii.

Au fost remarcate îndeosebi lucrările asupra glandei suprarenale și o monografie publicată în Anglia asupra morfologiei normale și patologice a glandei tiroide. Dintre cele peste 300 de lucrări publicate înainte de 1970 – anul plecării în Statele Unite, a fost deosebit de bine primită monografia dedicată "Histogenezei cancerului tiroidian", editată concomitent în Anglia și SUA. La Institutul de Endocrinologie, Simionescu a întâlnit-o pe Maya, o remarcabilă tânără cercetătoare care i-a devenit colaboratoare.

INSTITUTUL DE ENDOCRINOLOGIE

”Dragă Simionescu, nu te vrea partidul…” spune prof. Ștefan Milcu

În 1957, s-a mutat la Institutul de Endocrinologie condus la vremea aceea de Ștefan Milcu. I s-a oferit postul de cercetător principal și conducător al secției de Morfologie. Actul de mare curaj de a părăsi cele două catedre în care excelase și era prețuit de toată lumea, a fost mult comentat la vremea respectivă. Colegii, dar și profesorii au acceptat cu inima strânsă despărțirea de cel care făcuse deja demonstrația că rezistența prin știință în fața alienării era un fapt real, puternic, ”omologat”. De fapt, prin transferul la amintitul Institut, Simionescu nu abandona, ci, dimpotrivă, continua cercetarea științifică într-un domeniu ce se preta mai bine acestei munci și care părea mai apropiat de aspirațiile sale profunde. De la o ”situație cu posibilități”, Simionescu se lansa în ”aventura cercetării amenințate de numeroase incertitudini”(Prof. Șt.. Milcu).

Momentul transferului la noul loc de muncă este evocat cu farmec și emoție de regretatul Prof. Ștefan Milcu: ”În dimineața unei zile de septembrie, în sala de consiliu a Institutului de Endocrinologie, îmi solicită o întrevedere un tânăr cu o prezență de evidentă maturitate. El îmi cere posibilitatea de a lucra în cercetarea științifică, desfășurată sub coordonarea mea. Era domnul Nicolae Simionescu, ce-l știam ca fiind conferențiar anatomist și colaborator al profesorului Juvara. Renunța, deci, la o situație cu posibilități, pentru a se lansa în aventura cercetării științifice amenințate de numeroase incertitudini.

Evident, a fost primit și încadrat imediat în laboratorul de morfopatologie endocrină, cu obligația examenului extemporaneu al pieselor recoltate chirurgical și al cercetărilor impuse de complexitatea neoplaziilor tiroidiene. A fost de acord și in scurt timp s-a impus printr-o impresionantă devoțiune în activitatea de investigare, prin capacitățile organizatorice și o mare exigență în punerea la punct a unui laborator de specialitate.

Am fost impresionat de modul deosebit în care își desfășura activitatea. Ca un adevărat cercetător, n-avea program. Spre deosebire de majoritatea colegilor săi, din momentul angajării în investigație,

rămânea în laborator până târziu în noapte. Nu-i surprinzător că a reușit, în scurt timp, să pună în evidență existența cancerului medular al tiroidei, ignorat în colecția anatomopatologică a tratatelor de chirurgie endocrină. După îndelungi cercetări ale țesutului tiroidian, a reușit să izoleze noi forme de cancer. Bogatul material adunat zi și noapte a fost în cele din urmă transformat într-o prețioasă monografie intitulată ”Formele anatomopatologice ale cancerului tiroidian”, publicată în Editura Academiei Române și, la scurt timp, într-o editură din Londra”.

Dedicat științei, dar și promovării noilor aspiranți care nu aveau nicio vină că se întâmplase să fie tineri în acei ani crunți, Prof. Milcu a depus multe străduințe pentru deschiderea sistemului către lume, în special către cea occidentală. El întocmea sistematic liste pentru plecări în străinătate, la congrese și specializări. Tot sistematic, anumite nume dispăreau în cele din urmă de pe acele liste. Printre respinși figura, de fiecare dată, Nicolae Simionescu.

Aceste absurde refuzuri erau suportate cu destul stoicism de tânărul cercetător. Mai periculoasă fusese trecerea sa pe o altă listă: aceea a ”disponibilizărilor”. Partidul dorise să-l scoată cu orice chip din Facultatea de Medicină, fiind considerat un ”element nesigur pentru politica PCR” în domeniul învățământului. Ajunsese deja conferențiar. Dar, din fericire, partidul nu era întotdeauna atotputernic. Puținii oameni de caracter care mai rămăseseră în ”structură” acționau subtil și decisiv, dând lovituri eficiente, dar imperceptibile pentru ignoranța instituționalizată. În cazul de față, salvarea a venit de la Ministrul Sănătății, vestitul chirurg Theodor Burghele, care-și punea de fiecare dată rezoluția de neacceptare a concedierii sau ”transferului”, motivul fiind ”calitățile profesionale excepționale” ale conferențiarului Simionescu. Cu autoritatea funcției, dar mai ales cu aceea profesională (care înalt activist nu-și ducea rudele să fie operate la Burghele?), Ministrul îi trata întotdeauna cu superioritate pe emisarii partidului în ale cărui virtuți ideologice se pare că nu a crezut niciodată cu adevărat, chiar dacă a acceptat să fie ministru.

În 1952, când Nicolae Simionescu își susținea lucrarea de licență. România traversa o perioadă de ”rapide și drastice schimbări politice și sociale” (G. E. Palade), cauzate de procesul intens de comunizare impus de Soviete. Mulți români au fost ”captați de puterea roșie, dar mulți au reușit să-și păstreze un *status intern* și o imagine a ceea ce trebuie să facă pentru a nu pierde respectul de sine” (G. E. Palade).

Desigur, George Palade a avut norocul de a se afla departe de tragedia ce se consuma pe malurile Dâmboviței, dar admirabila sa conștiință de intelectual român de ”modă veche” nu i-a permis să asiste imperturbabil la dramele foștilor săi compatrioți. Atunci a luat, probabil,

hotărârea să ajute, pe cât îi stătea în puteri, lumea cercetării științifice de la București. El știa că sistemul nu poate fi detronat prin forță (în definitiv, care ar fi fost aceea?!), aflase de sinistrul târg de la Yalta, cunoștea prea bine firea vecinilor de la Răsărit și capacitatea multor români de a pactiza cu dușmanul în schimbul unor trecătoare avantaje personale. Dar tot atât de bine cunoștea marele savant categoria cea mai oropsită în acei ani de teroare: intelectualitatea provenită din vechile familii, dar și din pătura de mijloc, a oamenilor înstăriți. El presimțea că va veni o vreme când aceasta, printr-o rezistență culturală și științifică bine disimulată, va fi lovitura sistemului chiar din interior. De aceea, a așteptat momentul potrivit pentru a intra el însuși în acest joc. Moment care a întârziat până in anii '70 când, în urma unei vizite în Capitală (lucru devenit, iată, posibil), i-a selectat pe Nicolae și Maya Simionescu pentru programul de cercetare peste Ocean. Ideea va fi șocat nu numai aripa dură a Securității și Comitetului Central, dar chiar și oficialitățile americane, a căror jalnică prestație postbelică lăsase jumătate din Europa sub teroarea stalinistă.

Era în 1966 când s-a întors, după 20 de ani, G. E. Palade la București. Venea în calitate de membru al unei delegații a Academiei Naționale de Științe a Statelor Unite, iar vizita la Institutul de Endocrinologie condus de Ștefan Milcu, nu a făcut-o întâmplător: știa că fostul său cunoscut din "perioada anatomică Rainer", Nicolae Simionescu, lucra acolo. Auzise de la foștii săi colegi de facultate (Prof. I. Juvara) despre prestațiile sale excepționale în cercetarea glandei endocrine. Dorea, așadar, să ofere o șansă celui care merită din plin acest lucru, ca unul dintre cei ce nu-și pierduseră respectul de sine sub infernalul tăvălug al sistemului. G. E. Palade a văzut în acel tânăr pe unul capabil să spargă frontiere, să destrame convenții. Într-un articol publicat în Curierul Românesc scriam că, dacă nu ar fi primit Premiul Nobel pentru descoperirea granulelor care-i poartă numele (granule care asigură sinteza proteinelor), George Emil Palade ar fi trebuit să-l primească pentru… descoperirea lui Nicolae și Maya Simionescu!

Cercetând, chiar și superficial, activitatea lui Nicolae Simionescu înainte de 1970 (anul în care a plecat în America), constatăm că, oricum, el ar fi urmat traiectoria unui mare endocrinolog devenind , probabil, un respectat profesor universitar, specialist în neoplaziile tiroidiene. La data plecării în "aventura americană", avea la activ peste 300 de lucrări publicate și importante descoperiri științifice. După obținerea Diplomei de Merit în 1953, Simionescu va lucra alături de marele chirurg Ion (Cuti) Juvara, ca preparator, dar nu va putea refuza invitația "părintelui anatomiei", Gr. T. Popa, de a lucra, tot ca preparator, la Catedra de Anatomie. Au fost cinci ani de muncă intensă, îndrăcită chiar, în cursul

cărora tânărul ce ”se luase la trântă” cu două specialități deodată (când și una dintre ele ar fi fost prea mult pentru un medic obișnuit a reușit să studieze și să prezinte o serie de particularități în organizarea vasculaturii unor organe ca splina și pancreasul.

Mai târziu, când s-au dus ”luptele” pentru constituirea și dotarea IBPC, același T. Burghele a pus în joc toată autoritatea și capacitatea sa managerială pentru a face din acel incredibil proiect un fapt împlinit. Câteva scrisori trimise de el în America, acolo unde familia Simionescu ”spera împotriva speranței”, sunt relevante. Citǎm fragmentele potrivite.

”Dragă Nae,

Astăzi, într-o conversație mai prelungită, foarte constructivă, am căpătat imediat „le feu vert” pentru organizarea laboratorului de biologie celulară complet separat. Încă nu știu care va fi formula definitivă, dar în orice caz atmosfera este foarte bună și sigur peste câteva zile voi fi în stare să-ți dau detalii care te vor face fericit.

Te rog însă ca neîntârziat să-mi faci propuneri de dotare a acestui centru cu piese mari, importante, pe care am sarcina să le trec în planul anului 1973. M-ar interesa în același timp să capăt de la tine un plan, o schiță, o indicație de biobază, ce animale va conține, ce trebuie să cuprindă. În definitiv, m-ar interesa chiar planul exact al dimensiunilor, al compartimentelor, circuitelor, și, în fine, tot ce vei crede…” (18.10.1972)

* * *

”Dragă Nae,

Aștept cu nerăbdare schițele voastre, care vor fi executate întocmai. Suntem pe cale de a face tot ce este necesar pentru creșterea animalelor, și sunt convins că lucrarea va ieși foarte bine (…) Fondul s-a aprobat pentru întreaga construcție, precum și pentru import. Scrie-mi însă urgent unde dorești să te localizezi. Personal, mă gândesc numai la Facultatea de Medicină, deoarece vei avea acolo și sediul Catedrei, dar ceea ce vei decide va fi pentru mine hotărâtor…” (14.10.1973)

* * *

”Dragă Nae,

Mă grăbesc să-ți scriu pentru a-ți spune că mă voi ocupa intens de problema Centrului (IBPC-n.a.), care pentru mine este vitală. Te voi ține la curent… L-am refăcut așa cum a fost pe vremuri, fără nicio jenă, deoarece lumea trebuie să știe că la baza profesiunii stă învățământul. Au fost proteste vii, dar m-am ținut tare și am reușit… Lumea trebuie să fie convinsă că a sosit momentul de a promova competențe și nu a stânjeni mersul înainte…” (25.11.1973)

Cu un sprijin ca acela de la ministrul Burghele, nu e de mirare că familia Simionescu și-a urmat metodic, pas cu pas, "superstiția" de a se întoarce în România. "De ce, domnule Nae – a întrebat la New York, cu ocazia unei vizite, prof. Ștefan Milcu – de ce dorești dumneata să te întorci la București? Fără a sta pe gânduri, "Nae" a răspuns metaforic, dar foarte hotărât: "Vreau să sădesc și eu un pom în țara noastră, Domnule Profesor…"

În 1976, îi este conferit Premiul "Gh. Marinescu" al Academiei Române pentru cercetările de avangardă dedicate cancerului tiroidian. Această încununare timpurie a meritelor sale științifice îi va spori prestigiul în rândul endocrinologilor din Europa și SUA. Ca urmare, va fi invitat de Uniunea Internațională împotriva Cancerului ca expert la Institutul "Jules Bordet" din Bruxelles. Tot ca expert în cancerul tiroidian va fi invitat de Institutul "Gustave Roussy" din Paris și de "National Institute of Health" din Bethesda, SUA.

Deceniul 1965 - 1975 va aduce României o temporară libertate a sistemului bazat pe ideologia unică: un anume pragmatism tindea să cuprindă structurile politice, revărsând o oarecare bunăstare și calm în societate. Au fost anii deschiderii controlate spre Vest, care, dacă ar fi continuat, s-ar fi ajuns ca atât România, cât și dictatorul ei suprem, să aibă azi o cu totul altă soartă. Iar pe locul în care "cresc" acum 800 de cruci albe de eroi tineri și copii, s-ar înălța, poate, un institut de cercetări. Savantul George Emil Palade descrie admirabil această perioadă, în care Nicolae Simionescu "își va schimba destinul" părăsind endocrinologia pentru a forța primele frontiere într-o altă știință, inexistentă pe atunci în țara noastră: Biologia Celulară.

Întâlnirea cu Prof. G. Palade.

Își amintește prof. Palade, " după mai mult de 20 de ani de la plecarea mea din România, m-am întors în țara mea de origine ca membru al unei delegații a Academiei Naționale de Științe a Statelor Unite, pentru a negocia o înțelegere de schimburi științifice cu Academia Română. În acea perioadă, guvernul comunist al României încerca să obțină o margine de independență față de Uniunea Sovietică prin deschiderea unor ferestre către Vest. Viața era încă grea în România, dar cel puțin era evident că la orice nivel, de la oficialitățile guvernamentale, la profesorii universitari și până la cetățenii de rând, că românii erau hotărâți să-și afirme și să-și apere identitatea națională, fiind pregătiți să recunoască existența unor gradiente economice și științifice și să încerce să stabilească contacte cu lumea, dincolo de considerațiile doctrinelor politice".

Atunci a hotărât G. E. Palade să invite un cercetător român tânăr să lucreze în laboratorul de biologie celulară al Universității Rockefeller. El

își amintește: ”Îl cunoșteam pe Nicolae Simionescu din perioada studenției și i-am cerut un sfat vechiului meu prieten și coleg de clasă, Ion (Cuti) Juvara; răspunsul fiind entuziast, l-am invitat pe Nicolae Simionescu să vină la Universitatea Rockefeller. El a acceptat fără întârziere, cu toate că postul pe care-l puteam oferi – asistent de cercetare, era cu câteva trepte sub poziția de conferențiar pe care o avea la București”. În laboratorul lui Palade, descris recent ca ”leagănul biologiei celulare moderne”, Nicolae Simionescu s-a alăturat generației lui Günter Blobel, David Sabatini, Marilyn Farquhar și James Jamieson, actualii conducători ai biologiei celulare americane. El li s-a alăturat, spune Palade, ”cu ușurință și grație”, chiar dacă aceștia aveau, la început, dificultăți la pronunțarea numelui său.

Perioada Americană s-a prelungit de la un an la zece, lui Nicolae Simionescu alăturându-i-se, cu întârziere de șase luni, soția sa, Maya. A fost, desigur, mult de luptat cu autoritățile comuniste pentru a le convinge să elibereze un pașaport și pentru doamna Simionescu. Același geniu bun, G. E. Palade, a condus ”ostilitățile”. Își amintește: ”Lucrul (pentru cercetarea endoteliului vascular – n.n.) a demarat prompt și a progresat repede, dar există totuși un element care afecta dureros situația generală. Maya Simionescu era încă în București.

O serie de cereri insistente au reușit, în final, să o aducă la Universitatea Rockefeller, fapt ce a însemnat fericire. Nicolae și Maya s-au instalat în campusul universitar și munceau febril zi și noapte, pentru a face față competiției formidabile din domeniul nostru de cercetare”. Încă din 1970, Nicolae și Maya Simionescu au decis că în România trebuie și poate fi realizat un Institut de biologie celulară. În 1979, în urma unei finanțări nesperate din partea guvernului român, clădirea IBPC a fost inaugurată. În jurul celor doi, s-au strâns cei mai talentați tineri cercetători ai momentului, selectați în urma unor teste riguroase. Unii dintre ei fuseseră deja la specializare în Statele Unite, ca rezultat al intervenției profesorilor Simionescu și Palade. Entuziasmul tuturor avea o direcție, dar fiecare pas înainte urma să despice valuri de întuneric și frontiere nedefinite. O cursă fără sfârșit, în care se pornea, vorba poetului, ”cu Dumnezeu la cot”, și care nu oferea niciun indiciu privind obstacolele de pe traseu.

Prof. Simionescu își avertizase, de fapt, echipa:”În viitorul apropiat știm înspre ce ne îndreptăm, dar nu știm ce vom găsi. Am elaborat planuri, dar nu și predicții, pentru că, în realitate, dacă lucrurile ce vor fi găsite vor fi într-adevăr noi, ele sunt prin definiție necunoscute azi. Suntem tonifiați de fiecare informație nouă, dar în același timp fericiți că suntem atât de ignoranți, încât să facă din fiecare zi când reintrăm în laborator o confruntare cu propriul nostru intelect”.

PERIOADA AMERICANĂ
Între Palade și Gunter Barr.

Ziua fastă din 1968, în care George Emil Palade vizita Institutul de Endocrinologie, a fost descrisă drept un semn ceresc. Era perioada de deschidere a regimului, când apropierea de America devenise, incredibil, politică de stat (ne întrebăm unde ar fi astăzi România dacă acest drum nu ar fi fost abandonat în favoarea ”căii nord-coreene”!).

Într-un interviu acordat în anul 1993 dlui. Nicolae Țone (director, Editura Vinea), regăsim aceste prețioase amintiri:

”Prof. Palade a stat cu noi (lucram împreună cu Maya) în laborator, aproximativ trei sferturi de oră. I-am arătat ceea ce lucram. Așa cum îl știm, profesorul nu e un om care vorbește foarte mult, în special în primele lui reacții. Pot, deci, spune că întâlnirea n-a avut nimic extraordinar în desfășurarea sa. Noi i-am arătat ceea ce realizasem în studiul patologiei endocrine, într-o primă fază de cercetare în care introdusesem și metode de o performanță mai bună, cum era microscopia electronică ori citochimia, dar, repet, discuțiile, câte au fost, nu au depășit stadiul unei vizite protocolare. Practic, pe parcursul acelei prime întâlniri, a mea și a Mayei, cu prof. Palade, n-a fost vorba nici măcar o singură secundă de o viitoare colaborare…

Nu mică ne-a fost surpriza anul următor, în 1969, când am primit invitația de a lucra cu dânsul la Universitatea Rockefeller, pe o perioadă de un an, poate doi. Nu era vorba, deci, de o cooperare cu România, ci de dorința de a avea între oamenii din laboratorul său și doi români.

Numai că, în paralel cu această invitație, primisem o alta, de la prof. Gunter Barr, de la Institutul de Patologie al Spitalului ”Walter Read” din Washington, D.C. În 1968, fusesem trimis de Uniunea Internațională contra Cancerului în trei mari centre care studiau cancerul tiroidian. Eu făceam parte dintr-un grup care examina anual la Bruxelles, la Institutul ”Jules Bordet”, cazurile mai speciale de cancer tiroidian, ceea ce mi-a oferit prilejul câțiva ani de zile să interacționez cu experți din Europa în această problemă. A fost o activitate extraordinar de instructivă pentru mine. În același an, grupul european m-a trimis în SUA pentru a discuta cu experții de acolo, cu scopul de a ajunge la câteva puncte de vedere

comune privind felul în care trebuiau diagnosticate cazurile grele de cancer. Șederea la Institutul de Patologie mi-a adus, prin urmare, invitația pe care am amintit-o. Eram, practic, chemat să lucrez ca specialist în cancerul tiroidian câțiva ani de zile la un spital de elită, unde fuseseră operați președinții SUA, cu cadre medicale de prim rang.

Deci, în 1969, am avut aceste două invitații. Și nu ezit să vă mărturisesc că prima mea tendință, dincolo de ideea fascinantă de a fi alături de prof. Palade, a fost să merg la ”Walter Read”. Toată activitatea mea din ultimii ani fusese orientată spre patologie, aveam deja o oarecare poziție între specialiștii în domeniu și credeam că trebuie să continui în această direcție. Voiam să folosesc această cale pentru că, timp de 20 de ani, studiasem cancerul tiroidian la Institutul de Endocrinologie. Aveam chiar și o carte care fusese tradusă și publicată în Anglia și SUA (la editurile Heineman, respectiv Academic Press).

* * *

Autorul face aici o paranteză: vizionar și dăruit de Dumnezeu cu o mare putere de adaptare, inspirat și genial, Nicolae Simionescu a renunțat după 20 (douăzeci!) de ani la ceea ce fusese crezul vieții sale: studiul glandelor endocrine. Și a renunțat nu de pe poziția de om înfrânt și plictisit de atâta endocrinologie, ci, dimpotrivă, de pe o poziție extrem de favorabilă, de celebritate mondială invitată să lucreze ca specialist la unul dintre spitalele de elită ale lumii! Era pentru a doua oară când, de pe o astfel de poziție, stabilă și plină de promisiuni (cum a fost cea de chirurg și anatomist), Nicolae Simionescu pleca în necunoscut, acceptând aventura și incertudinea. În plus, nici nu se se poate spune că a renunțat la o carieră atât de strălucită de dragul Americii (ceea ce, pentru acele vremuri, ar fi fost o scuză generoasă), de vreme ce, ca cercetător în endocrinologie, ar fi ajuns tot în America.

În fine, o întâmplare oarecum anecdotică i-a limpezit gândurile și l-a îndreptat fără remușcări spre ”Rockefeller”. Cum spitalul ”Walter Read” era, la fel ca Spitalul Central din București, afiliat US ARMY, au început întrebările. ”A, vă duceți să lucrați pentru Armata Americană…”, au rostit tovarășii juriști din minister, frecându-și mâinile cu satisfacție. Până la urmă, nu i s-a aprobat plecarea. Deși o revenire și o audiență la ministru i-ar fi dat, probabil, în cele din urmă, câștig de cauză, Simionescu a renunțat la această variantă (renunțând, deci, la întreaga sa carieră), alegând să prezinte invitația de la Palade. Dar nici cu aceasta nu a fost atât de simplu… Negocierile, spune profesorul mai departe, în cadrul interviului acordat reporterului N. Țone, au durat mai bine de o jumătate de an. Mi s-a dat voie, în cele din urmă, să merg la Prof. Palade, acordându-mi-se viza pe o perioadă limitată de timp, prelungirea acesteia

constituind, în fiecare an, o veritabilă bătălie cu autoritățile. A contat atunci enorm ajutorul dat de Prof. Theodor Burghele care, pe de o parte, îl cunoștea și-l prețuia mult pe Prof. Palade, iar pe de alta mă cunoștea și pe mine. A fost un om remarcabil. Știu că există păreri împărțite în privința sa, dar a fost unul dintre oamenii deosebiți pe care i-am întâlnit în deceniile trecute (în deceniile dictaturii-n.a.). Pot să vă spun că tot Prof. Burghele este cel care a avut un rol pozitiv, hotărâtor chiar, în câștigarea interesului autorităților române pentru înființarea Institutului de Biologie și Patologie Celulară (a se vedea scrisorile – n.a.).

Universitatea Rockefeller – o scenă a permanentei căutări

În 1970, la 1 februarie, Nicolae Simionescu ateriza pe Aeroportul J. F. Kennedy din New York. Era singur, deoarece viza pentru soția sa [M.S] nu ”ieșise” încă, paznicii imensei pușcării numite România având încă ceva de căutat, ceva de scormonit în plasa birocratică a sistemului. Poate ar fi bine, își spuneau ei, să nu se mai ducă; dacă nu se mai întoarce? Să meargă, doamnă, numai domn’ profesor, dânsul e bărbat, înțelegeți… După ce vine dânsul, vă dăm drumul dumneavoastră și uite așa, faceți cu schimbul și toată lumea e mulțumită…

În mintea alfabetizată ”pe puncte” a securiștilor de la Pașapoarte ori a activiștilor, nu exista noțiunea de responsabilitate, de patriotism, de destin. Ei nu puteau înțelege că Nicolae și Maya Simionescu sunt savanți cărora frontierele convenționale nu le dădeau niciun fior. Patria se afla în ființa lor, în destinul lor de ”sclavi ai laboratoarelor”. Pentru ei, ”a rămâne” avea un înțeles mult mai profund decât pentru cei numiți cu ură de regim ”transfugi”.

Nicolae și Maya Simionescu ”au rămas” până la urmă, dar nu la New York, ci în… București! În cei zece ani ai așa-numitei ”perioade americane”, în care Simioneștii au cercetat în cele mai sofisticate laboratoare din lume, acumulând experiență și știință cât alții în două vieți, un întreg aparat de teroare, care a cuprins zeci de agenți și activiști bine plătiți, și-a pierdut timpul făcând pronosticuri dacă cei doi se mai întorc sau nu. Mii de ore de audiențe penibile, mii de dolari cheltuiți cu telefoanele și faxurile, o colosală energie risipită, nervi și tensiune cât pentru un zbor cosmic – toate aruncate într-o moară de măcinat-nimic, într-un malaxor-metaforă al celui mai ineficient dintre sistemele politice.

Nicolae Simionescu a aterizat singur, dar era decis să lase totul baltă și să se întoarcă, dacă soției sale, indispensabilă deopotrivă pentru viața și pentru știința sa, nu i s-ar fi permis să-l urmeze. Maya Simionescu avea un destin științific independent și în același timp complementar față de omul de știință care era soțul său. Ca biolog, doctor în științe, venea cu

o autoritate distinctă în toate proiectele comune de cercetare. După începerea lucrului alături de Palade, cei trei ajunseseră deja celebri printre colegii care-i numeau ”The famous Romanian Trio”.

Maya Simionescu își amintește: ”După lungi insistențe și scrisori trimise de Prof. Palade autorităților, mi s-a permis să plec abia la cinci luni după ce plecase Nicolae. Am avut o viză pe termen scurt, urmând ca la sfârșitul anului să mă întorc la București”. Orice om normal își poate pune întrebarea: de ce dorea regimul ca Maya Simionescu să se întoarcă înaintea soțului său? Cine ar fi avut de câștigat în acest caz? Fără comentarii.

Împlinindu-se timpul permis de viză, serviciul de cadre de la Ministerul Învățământului s-a pus pe treabă. Probabil câțiva politruci își vor fi râs în barbă când au cutezat să expedieze la New York o somație în care aveau tupeul să ceară imperativ Mayei Simionescu să revină la București. Momentul este descris cel mai bine chiar de Nicolae Simionescu, în interviul amintit:

”La termenul respectiv, a sosit o hârtie de la București care cerea ca Maya să plece acasă. Abia acum îmi dau seama (interviul a fost luat în octombrie 1993 – n.a.) cât de cuminți și inconștienți am fost amândoi. Adică, înțelegeți, eram somați să ne întoarcem și noi am fi putut pur și simplu să ne vedem de destinul nostru științific, adică să ignorăm adresele sosite. Dar noi, nu, ca niște copii foarte cuminți, foarte ascultători, am spus: ”Gata. Ne despărțim din nou”, și am pregatit bagajele Mayei pentru plecare. Era, într-adevăr, o demență să pleci din condițiile de acolo și să vii la București, pentru că așa a spus cineva de la serviciul de cadre al ministerului. Abia în ultima clipă, iarăși datorită intervențiilor Prof. Palade, Mayei i s-a permis să lucrăm mai departe împreună”.

Dar ce era Institutul Rockefeller? Cu ce anume l-a fascinat atât de mult pe Nicolae Simionescu? Iată descrierea Profesorului:

„Institutul Rockerfeller este un loc unic în lume din toate punctele de vedere, și nu puteai să nu fii mândru, ca român, văzând cât de prețuit era George Emil Palade. Departamentul condus de profesor avea o echipă formată din mai multe grupuri, unele dintre ele având chiar o oarecare independență. În orice caz, el era incontestabilul șef al nucleului. De altminteri, din grupul respectiv au făcut parte oameni care ulterior au fost inserați printre vârfurile mișcării internaționale în biologia celulară, cum sunt: David Sabatini, Gunter Blobel, Tashiro, Sieckewitz, David Luck ș.a. Au fost personalități care ulterior au devenit ele însele staruri, valori de necontestat. De altfel, aceasta este una dintre

particularitățile extrem de evidente ale influenței benefice pe care prof. Palade a avut-o asupra colaboratorilor lui. Chiar neștiind foarte mult la început în domeniu, după doi sau trei ani maximum petrecuți în departamentul lui, acumulările, perspectivele deveneau enorme.

Nu aș putea să spun foarte exact din ce motive anume colaborarea noastră, a mea și a Mayei, cu el a durat neobișnuit de mult, mult mai mult decât cu oricare dintre ceilalți colaboratori ai săi. Ne-am acomodat foarte repede, ne-am simțit foarte bine aflându-ne în permanență în preajma sa. Când profesorul s-a mutat de la Rockefeller la Yale, am mers împreună cu el, rămânându-i alături încă șase ani de zile. Zece ani în totalitate.

În fine, perioada Rockefeller a fost absolut unică. Locuiam în una din casele de oaspeți ale universității. Eram atât de uimiți de idea de a fi parte dintr-un anumit mediu intelectual și parte dintr-un anumit anturaj tehnologic, încât, acum, când citim sau ne aducem aminte de epoca respectivă, aproape ne pare un vis că vreme de doi ani de zile am ieșit numai patru duminici din laborator. Dar campusul Rockerfeller era cu totul special. Acolo aveai de toate: o sală de spectacole superbă, unde se dădeau săptămânal concerte; o bibliotecă imensă, de circa două milioane de volume, care aproape îți poruncea să te cufunzi în lecturi nesfârșite. Aveau loc în permanență conferințe pe cele mai variate teme, extraordinar de interesante. Partea alimentară nu era, de asemenea, o problemă: cofetărie, restaurant de bună calitate. Tot ce înseamnă bunăstare, liniște și civilizație era cu prisosință asigurat. Și bineînțeles, deasupra a toate, un laborator cum numai cu gândul, numai cu închipuirea îl puteai visa.

Un laborator excepțional în care se lucra fără normă, fără niciun fel de constrângeri în sfera de cercetare. Lucram, apoi, nu numai alături de Palade, care era magistral în tot ce făcea, dar și alături de niște oameni cu totul deosebiți. Fiecare dintre ei a devenit fie șeful unui departament, fie șeful unei școli de biologie celulară în țara sa: în Italia, în Japonia etc. Toți am fost sprijiniți și îndrumați de prof. Palade. Toți ne putem considera privilegiați, având șansa de a fi, în ultimă instanță, un produs al școlii respective, dominată de personalitatea lui Palade. Totodată, alături de influența profesorului, am simțit foarte mult influența ambianței generale. Spre exemplu, în blocul de laboratoare în care lucram noi, la momentul acela erau cinci laureați ai Premiului Nobel. De aceea, universitatea era cunoscută ca o veritabilă ”pepinieră de premii Nobel”.

* * *

Ajunsă în cele din urmă la Universitatea Rockefeller, alături de soțul

său și de Prof. Palade, Maya Simionescu n-a așteptat nici măcar să se obișnuiască cu noul fus orar. În primele două zile s-a pus la punct cu lucrările și proiectele, iar a treia zi a început să lucreze direct. ”Aveam de toate – își amintește doamna Simionescu – laboratoare, teren de tenis, apartament, bibliotecă, sală de concerte, cofetărie, o grădină superbă pentru plimbările de seară și jogging-ul de rigoare.

Începeam lucrul la 8,30 dimineața. Luam prânzul acasă sau la restaurant. Până la orele 18, ne aflam fără pauză în laborator. Apoi, urma cina și o scurtă partidă de tenis. Pe la orele 21, luam o bere la bar. După 21,30 ne întâlneam din nou în laborator, unde rămâneam până după miezul nopții. Era ideal să te concentrezi și să lucrezi cât te țineau puterile. Singurele limite erau propriile noastre limite. Noi și niște japs (japonezi) eram cei mai vrednici din universitate; lucram tot timpul. Dacă revăd cu ochii minții acei ani, era ca-n Paradis. Orice idee, orice substanță, orice tipăritură de pe mapamond ajungea la noi în maximum două zile. Ajunseserăm să credem că biologia celulară nu este o profesie, ci un „hobby”. Noi nu mergeam la serviciu acolo, ci la un spectacol al căutării. Trebuia să găsim ceva. Nu știam ce, dar trebuia. Ne stabilisem doar tema pentru viitor, pentru acasă: Biologia și Patologia Sistemului Cardiovascular. În rest, trebuia să ne luptăm cu valurile de întuneric. Cu Nenumitul. Cu Neaflatul”.

* * *

Aceeași ”aventură Rockefeller” a fost comentată, cu diverse ocazii, și de Prof. Palade. Iată observațiile celui care a creat practic ”leagănul biologiei celulare moderne”:

”Am socotit că laboratorul nostru ar putea încuraja deschiderea către Vest a României și am hotărât să invit un tânăr cercetător român să lucreze în grupul nostru. Nicolae Simionescu a acceptat fără întârziere, cu toate că postul pe care-l puteam oferi – asistent de cercetare – cu câteva trepte sub poziția de conferențiar pe care o avea la București. În perioada aceea, laboratorul de biologie celulară al Universității Rockefeller era la apogeul activității lui, care începuse spre sfârșitul decadei 1940 și a progresat în mod impresionant în decadele următoare. În acel laborator, care a fost descris ca leagănul biologiei celulare moderne, Nicolae Simionescu s-a alăturat generației lui Gunter Blobel, David Sabatini, Marilyn Farquhar și James Jamieson, actualii conducători ai biologiei celulare americane.

Împreună am decis să studiem organizarea și funcțiile endoteliului vascular, în mod deosebit a endoteliului continuu din musculatura corpului, din inimă și plămâni. Rezultatele anterioare ale laboratorului

duseseră la descoperirea unor noi structuri denumite vezicule plasmalemale, iar studiile efectuate în anii 1960 sugerează implicarea lor în transportul macromoleculelor (feritina) prin stratul endothelial al peretelui vascular. Dar multe rămăseseră de făcut pentru a defini în detaliu structura capilarelor sanguine și a altor segmente ale microvasculaturii și pentru a cerceta mai departe funcția veziculelor plasmalemale. Acest domeniu a devenit feuda științifică a lui Nicolae Simionescu. Lucrul a demarat prompt și a progresat repede, dar exista totuși un element care afecta dureros situația generală: Maya Simionescu era încă în București. O serie de insistențe au reușit, în final, să o aducă la Universitatea Rockefeller, fapt ce a însemnat încă un asistent de cercetare român și un progres mai rapid al proiectului nostru. De asemenea, a însemnat fericire.

Nicolae și Maya Simionescu s-au instalat în campusul universității și munceau zi și noapte pentru a face față competiției formidabile din domeniul nostru de cercetare. Pe de o parte, specialiștii în fiziologia capilarelor care dominau intelectual scena – pretindeau că toate schimburile transcapilare aveau loc prin pori situați de-a lungul joncțiunilor intercelulare și considerau alternativa (transportul prin vezicule plasmalemale) ca foarte puțin probabilă, dacă nu imposibilă. Pe de altă parte, uneltele de lucru și procedurile experimentale existente la acea vreme nu erau suficiente pentru a produce rezultate acceptate și convingătoare pentru biologii celulari. Nicolae Simionescu a utilizat o serie de trasori de diferite dimensiuni, toți fiind selectați pentru detecția porilor mici, postulați de specialiștii în fiziologia capilarelor, deoarece acești pori erau în acea perioadă principalul obiect de interes. Fundamentarea studiilor era clară și adeseori elegantă, dar competiția a rămas neconvinsă.

Studiile efectuate în acea perioadă au produs totuși un rezultat satisfăcător, important: descoperirea canalelor transendoteliale formate de vezicule plasmalemale fuzionate simultan cu ambele fețe (luminale și abluminale) ale plasmalemei endoteliale. Existența acestor canale a fost stabilită în mod convingător de Nicolae Simionescu și Maya Simionescu. De asemenea, importante au fost studiile lor în care au identificat segmentele diferențiate ale microvasculaturii din diafragmă și a descoperit joncțiuni deschise focale în endoteliul venulelor postcapilare”.

Universitatea Yale- Profesorul

În 1973, o parte din grupul Prof. G. E. Palade s-a mutat de la Rockefeller la Yale Medical School, unde a pus bazele unei noi secții de biologie celulară. După cum își amintește Nicolae Simionescu (în același interviu realizat de Nicolae Țone), mutarea la Yale a constituit prilejul ca cei doi români să-și adauge la activitatea științifică de la Rockefeller și pe aceea de învățământ. ”Ținând seama de experiența didactică pe care o aveam din țară - spunea în 1993 prof. Simionescu – am devenit, dintr-o dată, unele din cadrele vechi cu experiență (în România fusese cadru universitar timp de 20 de ani – n.a.). Așa am ajuns să ținem, rămânând în continuare alături de prof. Palade, cursuri de biologie celulară la Yale. Acolo, structura prelegerilor respective era în așa fel făcută, încât un curs ca acela de biologie celulară, ținut timp de trei luni în fiecare an, nu este predat de un singur om, cum se obișnuiește la noi. Este predat de 15-17 profesori, de regulă cei mai buni în disciplina respectivă, aduși de la diferite universități. În ceea ce ne privește, după ce ne-am întors la București - ceea ce s-a întâmplat în 1979 – anual cei de la Yale ne-au reînnoit funcția de *visting professor* și ne-au chemat să ținem cursuri aproape 20 de ani, fără întrerupere.”

Odată cu mutarea la Yale, studiile asupra vaselor sanguine au continuat fără întrerupere în noile laboratoare, ”Lucrările lui Nicolae Simionescu s-au focalizat clar pe endoteliul vascular, dar, așa cum era de așteptat din partea unui om de știință cu adevărat plin de resurse, cercetările lui au descoperit un spectru larg de teme, începând de la tehnici noi de fixare a țesuturilor și mordansare (cu galoilglucoză) pentru obținerea unui contrast optim, la noi trasori (particule de dextran și glicogen), la încercări reușite de a izola microvasculatura din miocard, mergând până la noi tehnici de studiu al joncțiunilor intercelulare (replici de specimene obținute din înghețare-fracturare).

Toate aceste studii experimentale au fost efectuate în colaborare cu Maya Simionescu, care adeseori a fost prim-autor. La acea vreme, Nicolae și Maya Simionescu erau deja recunoscuți ca biologi celulari de frunte, specializați în studiul endoteliului vascular și, în această calitate, reprezentau laboratorul nostru la diferite conferințe și întâlniri în Mexic și Japonia. Ceea ce era remarcabil, este faptul că de îndată ce schițasem

un domeniu de cercetare, studiile erau rapid și eficient realizate și extinse până la limita permisă de tehnologia zilei. Așa s-a întâmplat în cazul joncțiunilor endoteliale și al câmpului vascular bipolar în diafragmă. Și tot așa s-a întâmplat câțiva ani mai târziu, când au fost descoperite microdomeniile diferențiate ale plasmalemei endoteliale."

* * *

Începând cu 1974, Nicolae Simionescu a ocupat postul de profesor la Yale University, School of Medicine, unde a ținut prelegeri și demonstrații practice la cursul de Biologie Celulară. A fost, în același timp, conducător științific pentru teze de doctorat în medicină, la aceeași universitate. Experiența aceasta, de a împărtăși tinerilor americani din scurta dar intensa lui învățătură în domeniul biologiei celulare, i s-a părut o adevărată provocare. Din jurnalul ținut în această perioadă deducem importanța pe care o acordă românul acestor prelegeri fascinante. De altfel, receptivitatea studenților a fost totală, prezența și interesul pentru cursurile sale amintind, *mutatis mutandis*, de celebrele prelegeri călinesciene de la Universitatea din București.

Era iubit atât pentru carisma sa inimitabilă, cât și pentru calitatea excepțională a prelegerilor. Avea vocație pentru catedră, după cum avea vocație pentru laborator. Era jovial și informal, prietenos și răbdător, exigent, dăruit total științei. Nu umbla cu capul în nori, făcând poza einsteiniană, dar nici nu apleca urechea la fleacuri, nu-și pierdea timpul cu lucruri redundante. Vorbea simplu, direct, se ferea să devină repetitiv. Stilul academic american îl prindea de minune. I se spunea, cu admirație și caldă simpatie, "Doctor Si". Când trecea pe culoarele universității, înalt, elegant, zâmbitor, nu aștepta să fie salutat.

Avea o memorie neobișnuită. Învăța repede numele studenților și știa câte un amănunt din viața fiecăruia (cum va face mai târziu la IBPC). Nu pierdea nicio ocazie să schimbe o vorbă, fie și din mers, cu studenții. Vorbea o engleză americană frumoasă, aproape fără accent britanic, care făcea încântarea audienței. Cita adesea din clasici în latină, trimițându-și studenții la izvorul veșnic al înțelepciunii antice. Mulți dintre elevii săi aveau să devină excelenți profesori universitari sau valoroși cercetători.

Unul dintre aceștia, David Castle de la Universitatea Virginia, își amintește: "Nicolae m-a ajutat mai mult decât oricine altcineva să devin un bun profesor. Cu mândrie recunosc că am învățat cel mai mult despre biologia celulară a tuturor țesuturilor în cursul acelui prim an, când l-am secondat la orele lui de laborator pentru studenții de la Medicină. De

asemenea, a fost un maestru al predării prin metoda socratică și a fost totdeauna principalul meu model de urmat… nu pot să spun de câte ori m-am simțit fericit când mă gândeam că era mândru de mine…”

* * *

Simionescu atinsese apogeul în cariera sa americană când, în 1979, a luat drumul cenușiu al României. Vestea a răscolit cele mai dârze conștiințe americane de la Yale. Se știa că, în sfârșit, la McGill, Montreal, Canada, lua ființă primul institut de biologie celulară, cercetarea într-un spațiu special amenajat. Se mai știa că acel institut va avea cele mai noi dotări tehnologice, multe în premieră absolută, coborâte direct din programele secrete. În fine, se mai știa că Nicolae și Maya Simionescu primiseră oferta de a conduce acest institut. Salariul, așa cum am spus, depășea 42.000 de dolari pe lună. O sumă enormă pentru aceea vreme. Cam 60.000 de dolari la valoarea actuală! Luând act de refuzul neașteptat, oficialii canadieni au promis chiar o creștere a salariului plus alte facilități de instalare. Atunci, Nicolae Simionescu a trebuit să-și ceară mii de scuze față de prietenii săi americani și să încerce să le explice că, potrivit tradiției din țara sa, fiecare om e dator să planteze un pom, adică să lase ceva în urma lui.

Cu deosebire, le-a mai spus, că el face parte din savanții cu suflet, și de aceea nu se poate desprinde de țara natală. Pe de altă parte, America are deja destui specialiști în biologia celulară, pe când în România acest domeniu de cercetare este încă necunoscut. În plus, stimulat de deschiderea regimului de la București din anii ‘70, Simionescu provocase construirea și dotarea IBPC, trimisese 14 tineri la specializare cu burse Fulbright, cărase tone de substanțe și aparate, obținuse facilități la care nimeni nu visa pe vremea aceea în România, ”abătându-se” serios de la regulile de fier ale regimului dictatorial. Ca urmare, cum ar fi putut să lase acum totul baltă, doar de dragul unor câștiguri bănești, fie ele chiar fabuloase, față de ceea ce-l aștepta acasă?! A trebuit, de asemenea, să explice colegilor americani că el pornise chiar de la început cu ideea întoarcerii la București, ”perioada americană” fiind doar ocazia de a învăța și de a se perfecționa la cel mai înalt nivel, pentru beneficiul tinerei generații din România.

”Pentru noi”, a spus atunci Nicolae Simionescu, „dincolo de interesele noastre imediate, era necesar să-i ajutăm pe tinerii care ar fi dorit să urmeze aceeași cale. Probabil era la mijloc și un anumit sentiment care ținea de biografia personală, legat, în special, de suferințele pe care le-am îndurat în tinerețe. Pentru că am fost un chinuit în tinerețile mele, din

punct de vedere a ceea ce am vrut să fac și a modului dureros în care am fost marginalizat în permanență. Nu vreau să mă lamentez, dar nu pot să uit că mi s-au mâncat foarte prețioși ani din viață". Fără a se mai strădui să-i înțeleagă, oricât ar fi explicat, americanii și Prof. Palade s-au mărginit să-i catalogheze drept "patrioți superstițioși" și au decis să continue, orice s-ar întâmpla, colaborarea cu singurul institut de biologie și patologie celulară existent pe harta lumii la acea dată. Legătura București-Yale va fi menționată încă două decenii. Nicolae și Maya Simionescu fiind declarați aproape anual, când unul, când celălalt, drept cei mai buni profesori de biologie celulară de peste Ocean. Ei au reușit să se afle în permanență la cea mai înaltă cotă de apreciere din partea studenților de la Yale. De altfel, aceste calificative au fost deseori hotărâtoare în acordarea vizei de ieșire din România.

Și alte universități l-au avut profesor pe fermecătorul laureat al Premiului Bohum. Dintre acestea, sunt de notat: Columbia University, New York University, Harvard University School of Medicine, Boston; University of California Medical School, Los Angeles; McGill University, Montreal; University of Tokyo, Faculty of Medicine, Kyoto; Faculté Xavier Bichat, Paris; Faculty of Medicine, Lisabona etc.

Premii și Distincții.

Fiind, deloc surprinzător, printre cei mai citați cercetători români în literatura internațională (conform cu "International Citation Index – Washington D. C."), Nicolae Simionescu s-a bucurat de o largă apreciere în rândul savanților lumii, fiind răsplătit cu premii și distincții pe măsura valorii sale. Astfel, în 1975 va primi Medalia Facultății de Medicină din Thessaloniki și Medalia Societății de Științe Medicale și a Facultății de Medicină a Universității din Tokyo. Numele său circula în toate publicațiile și congresele de biologie celulară, și aproape nu exista proiect în domeniu în care să nu se facă referiri la Trio-ul Român (George Palade, Nicolae și Maya Simionescu).

După prelegerile ținute la Montreal, când cele mai încifrate date științifice deveneau, în "interpretarea" lui Simionescu, captivante aventuri în structura celulară. Institutul de Cercetări Clinice din orașul canadian i-a acordat distincția "Pfizer Fellow", în timp ce Universitatea McGill, în același an, 1978, i-a oferit importantul premiu "The Louis and Artur Lucian International Award for Research in Circulatory Diseases". Premiul a fost adresat, ca în multe alte cazuri, și Mayei Simionescu, deoarece Nicolae

și Maya au fost foarte apropiați nu numai în viață, dar și în știință.

Lucrând în tandem, ei au reușit, potrivit lui Palade, să ardă etapele și să avanseze într-un ritm amețitor chiar și pentru cei mai mari ”șoareci de laborator” ai Americii. Progresele lor se cuantificau aproape săptămânal, stârnind câteodată panică, dar de cele mai multe admirație printre colegi. Academia Internațională de Patologie cu sediul la Viena, ținând seama de activitatea de pionierat a IBPC în domeniul patologiei celulare (o altă scânteie de geniu a lui Nicolae Simionescu), i-a acordat, în 1986, Medalia Rokitansky. Aceasta, alături de Medalia ”Cea de-a 900-a Aniversare a Universității din Bologna”, 1987, avea să aducă pe malurile triste ale Dâmboviței o rază de bucurie și un sprijin neprețuit în lupta IBPC pentru supraviețuire.

“Invited Speaker” / Președinte/ Membru în Comitelul de organizare la Congrese Internaționale.

În multe universități și centre științifice a fost profesor vizitator și conferențiar invitat (invited speaker), ca semn al prestigiului internațional de care s-a bucurat toată viața.

A fost oaspete al numeroase institute și centre de învățământ din Irlanda, Franta, Belgia, Germania, Italia, Austria, Olanda, SUA, Suedia, Japonia, Rusia, Canada, Elvetia, Portugalia si altele (vezi CV - Anexa 1). În loc de alte comentarii, ni se pare relevant să lăsăm cititorului spre lectură tipurile, listele universităților, congreselor și workshop-urilor la care a participat, a ținut cursuri și a avut responsabilități organizatorice.

La numeroase congrese internaționale a avut responsabilități organizatorice, fie ca președinte, fie în comitetul de organizare

Consultant al unor instituții științifice, membru în colegii editoriale și societăți științifice internaționale.

Profesorul Nicolae Simionescu, celebru în lumea științifică mondială, a fost deopotrivă consultant al unor instituții științifice de pretutindeni. Este, poate, pentru prima dată după marele George E. Palade, laureat Nobel, când un om de știință român a cucerit globul pământesc cu forța sa intelectuală! Iată o parte din lumea experților, în care Simionescu era

invitat drept consultant: Thyroid Cancer Group din Uniunea internațională împotriva cancerului (IUAC); Institutul Național al Sănătății, Bethesda, SUA; Fundația Națională de Științe, Washington DC, SUA; Departamentul de Medicină Experimentală, Uppsala, Suedia; Institutul de cardiologie din Houston, Texas, SUA;

Consiliul de cercetări medicale din Londra, Anglia; Consiliul de cercetări medicale din Adelaide, Australia; Consiliul de cercetări medicale din Auckland, Noua Zeelandă.

Iată cum inegalabilul savant din București era „acasă" pretutindeni în sfera științifică! În mod firesc, făcea parte din colegii editoriale internaționale prestigioase precum Thrombosis Research, Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, Cell Differentiation, Endothelium, Science et Techniques de l'Animal de Laboratoire.

Nicolae Simionescu era, de asemenea, membru în numeroase societăți științifice internaționale: American Society for Cell Biology, American Thyroid Association, American Association for the Advacement of Sciene, International Society for Biological Rhythms, International Society for Stereology, International Society for Endocrinology, European Society for Experimental Surgery, European Society for Comparative Endocrinology, Italian Anatomical Society, International Committee on Laboratory Animals – ICLA (Governing Board), European Artery Club (Governing Board), European Vascular Biology Association.

O VIZIUNE LUMINOASĂ:
OPERA LUI NICOLAE SIMIONESCU

Înființarea Institutului de Biologie și Patologie Celulară
Ca un scut în calea sistemului.

Dovedind o discreție admirabilă, Acad. Maya Simionescu a vorbit destul de rar în public despre marele dispărut, preferând să-i lase pe alții să evoce personalitatea soțului său. Când a lăsat, totuși, ca anumite informații să ajungă în presă, a făcut-o cu o firească sobrietate. Iată, de exemplu, evocarea începuturilor IBPC.

”Răsfoind pentru prima oară jurnalul lui Nicolae Simionescu din America, am dat peste următoarele rânduri scrise în ianuarie 1970, la 13 zile după ce ajunsese acolo:” cât de mult mi-a lipsit până acum o atmosferă adevărată de viață științifică, de cercetare!... Ce simplă e, ce firească și de un singur fel... O, dacă aș putea crea un astfel de crâmpei de viață adevărată, măcar pentru generația următoare de căutători…”

Iată deci că ideea de a crea ceva pentru generațiile următoare o avea în minte și în suflet cu mult înainte de 1972, anul în care s-a lansat oficial înființarea IBPC.

După 1972, a urmat o perioadă de vis și luptă. Visuri – să reușim; luptă cu autoritățile, cu fondurile, cu găsirea terenului. Preocupat de experimentele sale, de găsirea de noi trasori, de elaborarea manuscriselor unor importante lucrări așteptate de editurile americane, Simionescu și-a făcut timp și pentru planurile detaliate ale institutului… din mintea sa, pe care le-a desenat singur, în cele mai mici detalii. Ca dovadă: cele cinci nivele ale IBPC, așa cum există ele în realitate, sunt identice cu cele desenate de medicul si biologul celular Nicolae Simionescu, a cărui excelență în arhitectură va anticipa extraordinarele creații ale fiului său, Vlad, co-proiectantul celor mai înalți zgârie-nori din lume, Turnurile Petronas din Kuala Lumpur, Malaysia.

În proiectul profesorului se regăsesc nu numai planurile exterioare, dar și detalii precum mesele de lucru, gurile de apă distilată, instalațiile de vacuum, amplasamentele becurilor de gaz și ale aparatelor mici, pozițiile

de cercetare etc. Concepția de flux de lucru îi aparține, de asemenea, și a mers bine de la început. La fel de importantă a fost ideea lui ca înainte de inaugurarea noului institut să formeze oamenii care vor lucra acolo. A venit în țară de 2-3 ori pe an și a intervievat tineri absolvenți, a ales cu grijă și a reușit să-i trimită, pe 14 dintre ei, cu burse Fullbright de un an în cele mai bune laboratoare din SUA.

„Când, în 1979, am inaugurat IBPC", își amintește Acad. Maya Simionescu, „au fost alături de noi și acești 14 tineri întorși de la specializare, precum și alți 60 angajați între timp pe baza unei selecții riguroase a profesorului. Inaugurarea a concis, în mod semnificativ, cu primul Workshop Româno-American, la care au venit unii dintre cei mai importanți cercetători din SUA, între care Prof. G. E. Palade și Prof. Ch. de Duve, savantul care a împărțit Premiul Nobel cu compatriotul nostru atât de celebru. De altfel, prof. George Emil Palade a avut un rol esențial în menținerea legăturii noastre cu lumea științifică din SUA. El a asigurat contactul oficial cu Universitatea Yale, unde Nicolae Simionescu și cu mine am rămas visiting professors pentru următorii 15 ani.

Desigur, este important să creezi un institut, dar la fel de important este să continui să creezi știință bună. Pentru asigurarea mediului ambiant științific, Prof. Simionescu a avut ideea deosebită de a promova în studiu o temă unică de cercetare de importanță majoră, și anume: biologia și patologia sistemului cardio-vascular, cu o atenție deosebită pentru ateroscleroză și tromboză, boala care ucide mai mult de jumătate din populație în țările avansate și medii. Ne-am pus pe lucru cu un avânt deosebit. Colaboratorii noștri tineri au fost extraordinari. Se lucra zi-lumină, se bea șampanie la orice rezultat ieșit din comun, se crea o familie științifică, o școală! Tinerii noștri se însurau, tinerele cercetătoare deveneau mame, dar treaba mergea ca un foc continuu. Atmosfera era unică. Mă întreb cum s-a putut face asta în perioada aceea atât de grea prin care treceam cu toții?

Dacă în 1972, când am început institutul, România părea că o luase pe o cale diferită de celelalte țări din lagărul sovietic, din 1979, când l-am inaugurat până în 1989, au fost ani de oribilă teroare spirituală. Era foarte greu. Eram considerați ca un implant american în România și, ca orice implant, puteam fi oricând rejectați. Cum am supraviețuit?! Cred că datorită staturii științifice, probității și luptei fără niciun compromis ale profesorului. El ridicat ca un scut în calea sistemului și în dreptul nostru, și nu a lăsat pe nimeni să ne atingă. Ne apăra pe noi și își apăra ideea. Institutul trebuia să supraviețuiască acelei perioade cumplite de care era foarte sigur că va dispărea repede. Chiar generația noastră, spunea, se va bucura de căderea sistemului comunist.

Financiar și material, am rezistat tot datorită profesorului, deoarece el a obținut, printr-o competiție dură, granturi de cercetare de la Institutul Național de Sănătate din Statele Unite. Asta era greu de înțeles pentru autoritățile acelor vremi. Împreună cu colaboratorii din Institut, am organizat 4 workshop-uri româno-americane, subvenționate în principal de NSF și NIH, organisme științifice americane. Era legătura noastră cu știința internațională, esențială pentru supraviețuire. Trei ani lucram pe brânci, ca să ne prezentăm cât mai bine la întrevederea cu colegii americani. Și am reușit, după cum spuneau chiar ei.

Am publicat mult, doar în revistele internaționale – acesta a fost un alt cap de acuzare împotriva lui Nicolae Simionescu și a mea. Că nu facem educație comunistă bună tineretului – era altă acuză, și multe altele. Și totuși, datorită profesorului, am introdus și am păstrat în toți acei ani grei, obiceiuri care să ne mențină moralul ridicat: serbam Crăciunul cu brad împodobit și colinde vechi; în sala de mese se cânta muzică clasică: îl serbam pe Eminescu în iunie 1989, recitând Scrisoarea III- a pe muzică de Enescu (ambele interzise în acea perioadă) și altele. Asta pentru că ideea profesorului Nicolae Simionescu era că IBPC „ a fost gândit ca o instituție de cultură în care se lucrează știință„. Trebuia să ne ocupăm de sufletul nostru în același timp cu producerea de știință bună. Așa a acționat profesorul până în ultima zi a vieții sale…”

Engleza, Emigrantul și Dolarii…

Medicul Constantin Neacșu, doctor în științe medicale și doctor în chimie, a fost cel dintâi angajat de prof. Simionescu la Institutul a cărui construcție încă nu începuse. Alături de soția sa, Corina Neacșu, încadrată mai târziu pe post de graficiană, el a demarat, practic, lucrările, supraveghind proiectul în lipsa profesorului. Ca urmare, amintirile sale din acele timpuri sunt deosebit de prețioase, anumite detalii nefiind cunoscute decât de el.

* * *

”Îl cunoșteam mai demult pe profesor, fusesem colegi în anii ‘50, eu la catedra de biochimie, el la catedra de anatomie. Ne-am reîntâlnit în 1957, la Institutul de Endocrinologie, unde eu coordonam laboratorul de biochimie, iar el pe cel de histologie. În fine, întâlnirea determinantă a fost în 1973, când mi-a prezentat ideea Institutului. Atunci am aflat că, în timpul celei de-a doua vizite în America, Nicolae Ceaușescu l-a felicitat pe George Emil Palade și ar fi spus: ar fi bine să avem un Premiu Nobel și în Romania! La care Palade ar fi răspuns: domnule președinte, îi aveți în perspectivă pe aceștia doi, Nicolae și Maya Simionescu… Se spune că imediat după aceea, întors la București, Ceaușescu ar fi dat dispoziție să se construiască IBPC.

Fapt e că în 1976, s-a consfințit pornirea Institutului. Am fost primul om lucrativ contactat. Am format o echipă de trei (eu și Simioneștii) și am pornit în căutarea celui mai potrivit loc. Profesorul a fost cel care a ales, în final, spațiul din spatele Facultății de Biologie. În plus, se afla în aceeași zonă universitară cu institutul Victor Babeș, cu Institutul Ion Cantacuzino, cu Facultatea de Medicină, cu Facultatea de Medicină Veterinară și cu Facultatea de Chimie. Toate acestea, inclusiv institutul nostru, ar fi fost demolate dacă mai trăia Ceaușescu un an sau doi.

Așa cum se știe, nimeni nu cunoștea tehnologia biologiei celulare, iar existența unui Institut central de biologie nu furniza nicio sugestie privind noul domeniu, înrudit, dar totuși foarte îndepărtat. De aceea, deși a desenat singur toate proiectele, profesorul a reușit să trimită pe timp de trei luni în America doi arhitecți care urmau să pună în operă planurile sale. Respectivii au avut astfel ocazia să înțeleagă subtilitățile și specificul laboratoarelor de biologie celulară, evitând în acest fel greșelile de proiectare și excepții ireparabile, care ar fi compromis, poate, viitorul Institutului.

Profesorului nu-i scăpa însă niciun amănunt, și n-a existat vreun detaliu constructiv, cum ar fi culoarea unei faianțe sau poziția unei ferestre, pe care Nicolae Simionescu să nu-l cunoască. A fost nu numai un manager științific, dar și un excelent manager economic și, dacă se poate spune, politic… A reușit, între anii 1976-1979, să obțină o finanțare de la guvernul român de neconceput pentru acele vremuri: 38 de milioane de lei si 700.000 de dolari! Lumea era uluită și invidioasă, în special tovarășii de prin ministerele Învățământului și Sănătății. Mergea vorba că plățile se făceau, la noi, în dolari, direct de la Washington, iar micii securiști care fremătau în jur răspândeau cu râvnă asemenea gogoși.

Când s-au adus microscoapele electronice, știrea a picat ca un trăsnet: chiar uzinele Philips fuseseră luate prin surprindere, deoarece primele E-400 de mare putere create aici, fuseseră comandate de București! La fel, un E-100 pentru uzul studenților.

O directivă dragă Profesorului, pe care m-am străduit s-o aduc la îndeplinire, a fost alegerea culorii faianței. La sugestia sa, fiecare nivel al IBPC are o altă culoare, după cum urmează: parterul, alb; etajul 1, lemon; etajul II, blue; etajul III, vernil. Deosebite sunt și ferestrele, model italian, precum și montarea la vedere a instalațiilor. Planșeul dublu, din aluminiu, agregatele de ventilație și aerul condiționat (ca sisteme alternative de încălzire), structura modulară a încăperilor, încălzirea termostată din baza de animale – toate sunt similare cu dotările institutelor din Occident, de fapt fără precedent în România.

După terminarea clădirii, pe care Nicolae și Elena Ceaușescu nu au

vizitat-o niciodată. ”Coana Leana”, se zicea, era supărată că n-a primit niciodată cadouri de la IBPC. Pe de altă parte, profesorul a luat asupra sa sarcina de a-i filtra pe noii angajați. Din peste 1300 de candidați, a selectat cu puțin peste 100 de tineri care au fost angajați. Una din condiții era cunoașterea limbii engleze (cam la fel cum caută azi, prin anunțuri, firmele străine din București). Îi trimitea adesea la bibliotecă, să citească, să conspecteze, să discute. Seminariile se țineau săptămânal, iar rapoartele de activitate se dădeau lunar. Prezentarea referatelor se făcea pe bază de postere și grafice, în engleză (chiar dacă erau de față numai oameni din institut, nu străini). Și cursurile pe care profesorul le ținea periodic, din proprie inițiativă, le ținea tot în engleză, astfel că atunci când veneau americani în vizită sau cu ocazia unor workshop-uri, nimeni nu avea complexe. Acest amănunt irita foarte mult ”Cabinetul 2”, deoarece se spunea că se creează un climat „cosmopolit „, imposibil de urmărit de către „organe”, ceea ce nu se putea admite la nesfârșit.

Odată, când au sosit din SUA 100 de pachete cu substanțe și alte consumabile de laborator, pachete expediate chiar de profesor, a fost trimisă o echipă de control, să verifice conținutul fiecărui pachet. Din fericire, și profesorul venise la București, iar când a auzit despre ce e vorba, s-a enervat foarte tare, interzicând pur și simplu echipei să intre în Institut. Ministrul Învățământului de atunci, o figură de tristă amintire, nu l-a iertat niciodată pentru acest afront, și cât a mai fost în funcție, a căutat să-i pună câte piedici a putut.

Pe Profesor îl respectau, desigur, și securiștii. Era maiorul Palade și șeful lui, colonelul Ștefan, care se consultau cu noi de câte ori urma să plece un om de la Institut în străinătate. O lovitură de imagine care ne-a adus oarecare confort pe termen lung în relațiile cu Securitatea, a fost întoarcerea unui emigrant din America. A venit într-o zi o doamnă de vreo 60 de ani și ne-a întrebat dacă nu am putea să-l aducem înapoi pe băiatul ei, Mugur Badea, specialist în biofizică la Cornwell University, în SUA. Profesorul a spus că-l va angaja, iar doamna Badea a plecat în America să-și convingă fiul să se întoarcă, după 8 ani de la emigrare. Băiatul a întrebat ce condiții va avea la București. Aflând că acestea vor fi similare cu cele din Statele Unite și că Prof. Simionescu intervenise pe lângă autorități pentru ca să nu pățească nimic, Mugur Badea s-a întors la București”.

”Furia demolărilor a fost aproape să cuprindă și IPBC, dar și toate facultățile și institutele din jur. Argumentul tovarășilor era că nu se poate admite existența în apropierea Palatului Poporului a unor animale de laborator, care ar fi putut răspândi boli. În plus, la „ Cantacuzino” se găseau și culturi de viruși, iar la IBPC, culturi de celule. Ceaușeștii, după cum se știe, erau foarte speriați de microbi și boli, așa că soarta noastră

fusese pecetluită. Din fericire, toată forța de muncă disponibilă lucra încă la Palat, deci nu avea cine să demoleze, dar situația ar fi putut să se schimbe pe neașteptate. Nici ideea construirii unui zid la stradă, în fața institutului, nu părea să aibă prea mulți sorți de izbândă. Lipsa de respect pentru tot ce se făcuse în IBPC se manifesta chiar și la nivele mai mici: directorii care coordonau lucrările de amenajare a Dâmboviței ordonaseră ca toate resturile și pământul rezultate din operațiunea de dragare să fie depozitate lângă Institut. Era o priveliște groaznică și o sursă de infestare generală. Abia după multe intervenții ale Profesorului s-a făcut în cele din urmă curățenie, dar audiența lui în cabinetele puterii slăbise considerabil, fiind privit, în nebunia care cuprinsese cuplul dictatorial, drept șeful unei oficine de spionaj american.

Doar Revoluția din Decembrie a fost salvarea institutului nostru: nici măcar Palade nu mai avea vreun cuvânt de spus, iar ceilalți prieteni americani laureați ai Premiului Nobel, odinioară îndemnați să viziteze România, nu mai contau. Cu toții am trăit în acele luni emoții puternice: ni se părea absurd să distrugi o capodoperă a infrastructurii cercetării românești, după ce se investise atât de mult în ea. Viața și idealurile profesorului se vedeau călcate în picioare de prostia ajunsă în fruntea statului. În niciun caz, prof. Nicolae Simionescu și nici noi, ucenicii săi, n-am fi avut energia și impulsul de a construi un alt Institut. Era clar pentru toți că demolarea ar fi însemnat sfârșitul biologiei celulare în România, cel puțin câteva decenii. Iar viitorimea ar fi vorbit despre IBPC ca despre o Atlantidă a științei românești, scufundată în oceanul de ignoranță care ne-a guvernat țara aproape cinci decenii."

IBPC – "Al 51-lea Stat al SUA"

- Glenn Schwaitzer -

Într-o evocare pe cât de sensibilă, pe atât de exactă și specifică stilului său olimpian, G. E. Palade observa în anul trecerii în neființă a Profesorului Simionescu (1995) că una dintre moștenirile lăsate de marele său colaborator a fost "o exigentă dar luminoasă viziune asupra viitorului științei biologice și biomedicale în România". De fapt…întreaga operă științifică și organizatorică a Prof. Nicolae Simionescu a stat sub semnul acestei viziuni luminoase, deoarece a fost cu siguranță unul dintre puținii români care au reușit să aducă viitorul mai aproape de noi, impunând un mod de gândire și un stil de lucru rupte parcă din acest viitor.

Pentru standardele balcano-comuniste impuse instituțiilor statului totalitar,

Standardul Simionescu (numit uneori Experimentul Simionescu) părea o veritabilă călătorie în timp, o ”spărtură în cercul luminos al patriei”, prin care pătrundeau ”agenturile” și ”virușii” unei alte lumi. Dacă ar fi înțeles bine ce ”pericol” prezenta IBPC-ul pentru ”frumusețea” liniară a gândirii atestate de dictatură, regimul ar fi trebuit să impună o carantină permanentă în jurul acestui Institut. Când autorul anonim a creat bancul cu milițianul care cere azil politic într-un dollar shop, el a pierdut din vedere că și acest Institut de biologie era un fel de shop în care ți-ai fi dorit să lucrezi, să trăiești și să admiri lumea celulei, numai să poți uita de iadul de afară. Când Glenn Schwaitzer, director general al Fundației Naționale pentru Știință din SUA, a vizitat pentru prima dată Institutul, a fost extrem de surprins că această ”oază științifico-culturală” a putut supraviețui în ambianța dictaturii. ”Nicolae”, a mărturisit americanul, „știi care este feeling-ul meu despre institutul vostru? Că sunteți al 51-lea stat al SUA”.

Un pionier al… Estului Sălbatic.

Evocând ”darurile” lăsate posterității de Nicolae Simionescu, marele cercetător american și prieten al profesorului, Guido Majno, de la University of Massachusettes, spunea: ”Nicolae Simionescu ne-a lăsat un monument viu, Institutul de Biologie și Patologie Celulară, un institut cu o denumire și o misiune frumoasă” (1995).

Într-adevăr, IBPC este, poate, cea mai importantă operă lăsată de savant viitorimii. Încă de la descoperirea, în America, a importanței cercetării în domeniul de pionierat al biologiei celulare, el s-a gândit că ar trebui să existe și în București, la îndemâna tineretului studios, o instituție în care să se pună bazele unei școli de biologie și patologie celulară. Și în România mureau oameni de pe urma aterosclerozei și aici existau cercetători talentați și pasionați de științele fundamentale. Pe măsură ce progresa peste Ocean, uimindu-i pe americani cu intuiția și inteligența sa sclipitoare și urcând treptele afirmării academice, Simionescu își consolida ideea creării Institutului de la București. În mod paradoxal, își construia o carieră de invidiat în universitățile Unchiului Sam, intrând în admirația celei mai exclusiviste elite, pentru a reveni să ia totul de la zero în umila cetate a ciobanului Bucur.

El avea însă conștiința ziditorului. Era, în multe privințe, un pionier al Estului Sălbatic. Mașinăria pe care o pusese în mișcare, de voia sau de nevoia partidului, funcționa și atrăgea în aura ei magnetică piloni importanți ai sistemului. Privind înapoi la anii în care s-a construit Institutul, ai senzația că profesorul acesta misterios, care a folosit

America pentru a cuceri… România, s-a bazat pe fenomene paranormale. Printr-o ”vrăjitorie”, el a evitat anevoiosul traseu al aprobării proiectelor de arhitectură, desenând totul cu mâna sa: prin același procedeu, a folosit materiale de construcție prohibite, precum aluminiul și sticla specială, destinate exclusiv exportului; TAROM-ul îi aducea tonele de aparate și substanțe contra lei și contra valută, cum scria legea, miniștrii își puneau semnăturile pe referatele sale așa cum le primeau, fără comentarii, constructorii lucrau zi și noapte, cu betoane rapide, și acelea luate din cota pentru export: locul ales pentru construirea Institutului a fost validat fără observații de către Primărie etc.

Și aceasta, în condițiile în care nimeni nu știa ce înseamnă biologia celulară și cât va folosi ea la… construirea socialismului. Mai mult, mare parte din lucrările brute s-au efectuat în absența profesorului care venea o dată pe an din America, să constate progresele făcute. Este evident că succesul s-a datorat exclusiv imensului său prestigiu care a învins, cel puțin temporar, chiar și suspiciunea devenită rațiune de stat. Câțiva dintre cei care s-au aflat încă de la început alături de Nicolae Simionescu, supraveghind lucrările, refac într-o oarecare măsură, prin amintirile ce urmează, anii de neuitat ai tinereții IBPC.

Simionescu și Arta Soluțiilor.

Atunci când a contribuit cu sume importante la construirea Institutului de Biologie și Patologie Celulară, regimul comunist, pe lângă faptul că se afla în faza sa benignă, a sperat că va avea în IBPC un ”aliat supus”, prin care, la adăpostul științei celei mai pure, își va putea lansa în mediile occidentale, ”cartușele” bine țintite ale propagandei politice. În gândirea sa schematică, cuplul dictatorial de la București a încadrat, la un moment dat, Institutul în seria succeselor sportive. Așa cum Nadia Comăneci sau Ilie Năstase puneau pe harta lumii ”grija nețărmurită a partidului pentru dezvoltarea sportului”, în mintea celor doi și IBPC ducea peste Ocean ”dovada grijii părintești” pentru știință. Mai complicat a fost atunci când atât Nicolae Ceaușescu, dar mai ales Elena Ceaușescu au observat că sunt ignorați, iar partidul ”în întregul său”, nu are nicio contribuție în elaborarea programelor de cercetare de la acest Institut. Pur și simplu, IBPC le scăpa printre degete ”ca aburul prin țevile sparte”, cum ar spune un mare scriitor. Treptat, Elena și-a reglat tirul atacurilor asupra Institutului, așa cum era capabilă să o facă: mai întâi, nu l-a mai primit pe Palade, considerat omul care trăsese sforile și ”păcălise conducerea superioară”. Apoi, ca o consecință, Nicolae și Maya Simionescu au fost ”consemnați” pe lista dizgrațierilor, ca pedeapsă pentru poziția lor de ”Cai Troieni” ai ”intereselor americane”.

Tovarășul Postelnicu, șeful Securității, a lansat deja acuzația de spionaj în favoarea unei puteri străine. Motivul principal: ”Tot ce ați lucrat, toate temele pe care le-ați avut n-au fost niciodată aprobate de statul român” (Ministerul Învățământului către Nicolae Simionescu). Așadar, se insinua că IBPC lucrase particular, de capul lui. ”Ceea ce”, va recunoaște prof. Simionescu, „era chiar adevărul”. Niciodată o temă de cercetare a IBPC nu ajunsese pe biroul ”Cabinetului 2”, la ”aprobare”. De altfel, pentru nivelul intelectual al ocupantei acestui cabinet, oricum termenii din biologia celulară n-ar fi avut vreun înțeles.

Prima consecință a răzbunării a fost tăierea oricărei contribuții financiaree pentru menținerea în activitate a Institutului. ”Regretăm”, i s-a spus Profesorului, de la Ministerul Învățământului, „dar din momentul acesta sunteți fără niciun ban”. Povestește Nicolae Simionescu mai departe: ”Și atunci, soluția a fost una singură: să apelăm la subvenții din afară. Am intrat, astfel, în sistemul de competiție pe care-l folosesc Institutele Naționale de Sănătate din SUA (NIH). Și, spre șansa noastră, înregistrând scoruri științifice bune, am primit timp de nouă ani subvențiile solicitate. Am fost singurul institut din Europa de Est care a beneficiat de un astfel de sprijin. În total, fondurile puse la dispoziție de NIH s-au ridicat la 400.000 de dolari. În plus, eu și cu Maya ne-am făcut un obicei – nu foarte confortabil, nu foarte simplu – din a aduna materiale pentru Institut. În acest mod, colectam de la prietenii noștri, de la colegi, de la cunoscuți din SUA, chimicale, cărți, reviste, chiar unele piese de echipament ori unele aparate mai costisitoare.

În medie, transportam cam o tonă de materiale și echipament în fiecare an. Cu totul, am transportat peste 14 tone, în valoare de peste 800.000 de dolari, amortizând astfel investiția făcută de stat în Institut. Practic, fără aceste materiale Institutul nu ar fi putut funcționa. Dar nu era deloc amuzant să împachetezi cele mai bine de 100 de colete, să le încarci (numai Maya și cu mine), pe urmă să șofezi camionul, care avea două tone, să-l duci pe drumul spre aeroport (2 ore), apoi să descarci aceleași colete la aeroportul Kennedy. La Otopeni, soseam tot noi să le descărcăm. Aici, ne ajutau colaboratorii. Câte un coleg, mai în glumă, mai în serios, se plângea: domn’ Profesor, nu mai faceți așa grele coletele! Faceți-le mai ușoare…” (Profesorul, pentru ziaristul N. Țone).

Tot ca o formă de ajutor pentru IBPC, din partea colegilor americani, a fost trimiterea de studenți pentru a-și face lucrările de diplomă la București. Acești studenți veneau vara și stăteau trei luni, învățând mai multe decât ar fi învățat la Yale. În total, 7 absolvenți americani și-au început lucrările de diplomă în special sub conducerea Mayei Simionescu. La început, tinerii americani n-au avut prea mult curaj,

auziseră atâtea nenorociri despre România și își imaginau că aici își pot pierde chiar viața. Cel dintâi care a spart gheața a fost Fred Santoro, astăzi profesor vestit peste Ocean. După cum își amintește doamna Maya Simionescu, acest băiat, prin hotărârea lui de a ateriza în țara lui Dracula (fie el cel din legendă sau cel aflat chiar atunci la putere), a semănat discordie în familia sa. Dacă doamna Santoro nu s-a mai oprit din plâns ”around the clock”, rămânând chiar cu ușoare afecțiuni cardiace din acel șoc, domnul Santoro, adevărat bărbat, s-a arătat mândru de curajul fiului său. Care fiu, cu o dezinvoltură specific yankee, s-a acomodat foarte bine și repede pe malurile Dâmboviței ”cea frumos curgătoare”.

* * *

Cel puțin o parte dintre cititorii acestei cărți se vor întreba, fără îndoială: Care este contribuția concretă a IBPC la dezvoltarea științei celulei? Ce anume au făcut Nicolae și Maya Simionescu pentru dezvoltarea biologiei celulare? Cum ne aflăm tot în cadrul capitolului rezervat operei lui Nicolae Simionescu, vom spune că, după crearea Institutului, profesorul s-a străduit să umple ”forma” cu un ”fond”, care a rămas, firește, cea de-a doua față a moștenirii lăsate de el posterității.

Un mare cercetător, Peter Medawar, definea știința drept ”arta de a găsi soluții”. Observăm cu ușurință, din cele spuse până acum, că de fapt întreaga viață a lui Nicolae Simionescu, savantul total, a fost o artă a soluțiilor. Trăind într-o vreme și într-o țară în care normalitatea nu se mai oferea individului în mod direct, natural, ci se lăsa descoperită cu greu în dosul opacității regimului, el a fost nevoit să ducă o luptă epuizantă pentru a descoperi soluții. Și a reușit. A fost, poate, românul care a descoperit cele mai multe soluții în ”anii lumină” ceaușiști. Soluții manageriale, soluții științifice, soluții politice – toate văzute atunci ca un apanaj al normalității pe care i-o programase însuși destinul.

Vorbind strict de soluțiile găsite în laborator, acolo unde imaginația sa creatoare îl transporta într-o realitate ”paralelă” în care evada până la uitarea de sine, găsim că nu i-ar mai fi trebuit mult până ar fi ajuns pe lista nominalizărilor pentru Premiul Nobel. Ambițiile i-au fost mari; munca, titanică. Dorea pur și simplu să afle de ce fac oamenii infarct. De ce li se sclerozează arterele. Cum se poate transporta medicamentul direct la locul afectat în câteva secunde, pentru a acorda cât mai multe șanse de supraviețuire.

Al doilea… unicat: Biobaza.

Este general acceptată ideea că IBPC a fost și este încă un unicat în peisajul cercetării științifice românești. Chiar dacă, din gelozie sau calcule meschine, profesorii de la Medicină n-au permis niciodată studenților, înainte de '89, să-și ia teza de licență și să cerceteze în acest Institut. Era exact perioada în care 7 (șapte!) absolvenți americani solicitaseră asistență profesorilor Simionescu pentru a-și susține teza de licență la București. Probabil, pentru unii politruci de la IMF strecurați în conducere, ceea ce se întâmpla sub direcția lui Simionescu nu era altceva decât ceea ce credea "tovarășul" Postelnicu și șefa dumisale: spionaj american. În consecință, nu era cazul să permită studenților educați în mediul "aseptic" creat de partid, să se contamineze de ideile decadente ale științei pure americane. Au fost aceeași politruci care, în toate acele decenii de restriște, când accesul tinerilor studenți și medici la literatura științifică occidentală devenise prohibită, nu au profitat de prezența la București, în atâtea rânduri, a Prof. Palade, să-l invite să țină cursuri de care ar fi profitat nu numai studenții, ci și orice medic sau cadru universitar serios.

Dar IBPC a supraviețuit în ciuda tuturor, iar la etajul al treilea din clădirea sa, Profesorul a mai organizat un… unicat: Biobaza. Adică baza de animale de laborator. Și în acest domeniu s-a întâmplat ca Nicolae Simionescu să fie un excelent expert. După experiența de la Institutul de Endocrinologie, unde a condus Departamentul tehnico-științific, adăugată stagiului american, el a fost printre cei dintâi (dacă nu chiar cel dintâi) care a înțeles rolul unui sector de animale dezvoltat pe criterii moderne, pentru crearea unor condiții standard, neviciate de caracteristici diferite ale animalelor de experiență. Mai popular spus, dacă azi aveai niște rezultate pe inima unui cobai crescut cu tărâțe, nu puteai avea aceleași rezultate a doua zi, când operai un cobai crescut cu proteine sintetice. Într-un fel răspundea experiențelor hamsterul crescut în condițiile de temperatură rezervate oamenilor și în alt fel cel ținut de Prof. Simionescu, în aer condiționat cu termostat.

Responsabil cu acest laborator vital al IBPC a fost, încă de la început, un domn sobru, sas de origine, dr. Anton Hillebrand, specialist în medicină veterinară. Domnia sa a ținut să aducă o contribuție la redactarea acestei cărți prin următoarea relatare:

* * *

"L-am cunoscut pe Prof. Simionescu la începutul anilor '60, când îmi era șef direct la Institutul de Endocrinologie. În acea vreme, și mai mult după aceea, acorda o atenție deosebită animalelor de experiență, așa precum în țările cu economie avansată, unde se punea problema din ce

în ce mai acut, de a avea animale uniforme din punct de vedere genetic, care să fie menținute în condiții standardizate de mediu. Aceste condiții se repercutează și asupra modelelor experimentale create, dar și asupra concluziilor trase de pe urma diferitelor investigații și posibilităților de repetare și control al experimentelor.

Văzând diferența clară între situația care exista la noi și ceea ce trebuia să fie pentru acele timpuri, Prof. Simionescu a căutat mereu să îmbunătățească situația, în primul rând în cadrul Institutului de Endocrinologie și apoi în celelalte Institute de profil din cadrul Academiei. Între timp, s-a creat un organism internațional privind animalele de laborator (ICLAS = International Committee on Laboratory Animal Science) care funcționa sub auspiciile UNESCO.

Prof. Nicolae Simionescu a fost numit reprezentantul României pe lângă ICLAS. Acest lucru a contribuit la o mai bună înțelegere a problemei, deoarece în calitatea pe care o avea putea să meargă la simpozioanele anuale ICLAS, care se țineau în diferite țări avansate, totodată reușind să-și facă relații cu persoane specializate în domeniu. În acest fel, s-a documentat la fața locului despre ceea ce trebuie să reprezinte animalul de laborator în cercetarea biomedicală modernă.

Stagiul de lucru în Statele Unite i-a consolidat această imagine. Ca urmare a cunoștințelor acumulate, a aplicat tot ce era mai modern în proiectarea Institutului de Biologie și Patologie Celulară, astfel că începând cu construcția edificiului și trecând la amănuntele privind amplasarea biobazei în cadrul clădirii, a reușit să imprime pentru prima oară în țara noastră aspectul modern, de ultimă oră, al unei crescătorii de animale de laborator în cadrul Institutului de cercetare biomedicală.

Acest sector a constituit un unicat la noi, astfel că de-a lungul anilor, o mulțime de persoane care urmau cursurile de specializare în domeniul animalelor de laborator (studenți ai ultimilor ani de studiu de la Facultatea de Medicină Veterinară și Facultatea de Zootehnie, ca și medici veterinari din țară) veneau să viziteze sectorul de animale de experiență al IBPC. Prin aceasta, Prof. Simionescu a demonstrat ușurința cu care se acomoda diferitelor altor specializări, punând în practică formule deosebit de moderne, din care nu a lipsit niciodată amprenta personală ce se regăsește în tot ce a întreprins.

Supărarea securistului Manea și a tovarășei de la Partid

Ca fiecare instituție, IPBC avea securistul său oficial, pe lângă eventualii informatori. În orice caz, toată activitatea institutului era pusă la vedere, și nu exista niciun motiv de teamă pentru nimeni. Chiar dacă,

astăzi, vorbim de rezistența anti-comunistă a acestui Institut, nu ne închipuim că Profesorul sau adjuncții săi țineau speech-uri contra partidului, ori plănuiau lovituri de stat. Știința și cultura adevărată, care se desfășurau aici în timpul și după programul de 8 ore, cultivarea valorilor indiferent de background-ul lor politic, înălțarea spiritualității la rangul de lege morală, cultivarea prieteniei și a familiei, a pasiunii pentru frumos și pentru tradiții: în fine, impunerea respectului reciproc drept normă colegială – acestea au fost ”armele” cu care IBPC a luptat contra sistemului pe care l-a și învins. După cum era de așteptat, oricâtă ”omenie” ar fi manifestat un maior sau un colonel de securitate, ei nu puteau ieși din ”fluxul sistemului” pe care aveau sarcina să-l apere. Degeaba a spus, mimând surprinderea, colonelul Ștefan, la auzul isprăvilor pe care căpitanul Manea le făcuse în Institut: ”De ce nu mi-ați spus până acum?” Adică el, colonelul, nu avea, vezi-Doamne, habar de subalternul său… când acesta fusese trimis ”cu decizie”, și nu venise de capul lui la IBPC.

Dar cine a fost și ce a făcut Manea?

Într-o zi, Profesorul a primit un telefon de la Ministerul Învățământului: la celălalt capăt al firului, un personaj sus-pus a lăsat să se înțeleagă că postul de inspector de personal, ținut liber de institut, trebuie de îndată ocupat. Omul fusese găsit chiar la ”forul tutelar”, adică la minister, în persoana unui securist pensionat de la serviciul de cadre. Practic, ministerul dorea să scape de acest căpitan mult prea incomod pentru toată lumea. Și s-a gândit să-i facă un ”bine” Prof. Simionescu, fiindcă și așa circulau destule zvonuri despre independența prea largă pe care o aveau oamenii acestuia (se spunea, de pildă, că la ședințele de partid citeau din Eminescu, ascultau muzică de Enescu, sau vorbeau despre patriotism prin ridicarea nivelului de cultură și câte și mai câte…).

De unde să știe Profesorul că Manea este un adevărat stalinist? N-a trecut multă vreme, și omul și-a dat arama pe față. Scrofulos la datorie, a început prin a-i reproșa profesorului angajarea unor tineri al căror dosar nu era tocmai ”curat”, chiar dacă erau buni la biologie sau fizică… A continuat prin întocmirea de referate privind activitatea fiecărui angajat, menționând până și zilele în care a întârziat cinci minute. Stătea la intrare și nota, cu seriozitate, fiecare minut de întârziere. Pentru a-și completa informațiile din dosare, se ducea acasă la fiecare și lua referințe de la vecini, cerceta în arhive și găsea ”pete” în trecutul părinților unora dintre cercetători. Era mereu încruntat, vorbea puțin și întotdeauna cu ”subînțeles”. Când se enerva, te amenința sec: ”las’ că te aranjez eu…” Se ducea la direcțiune și striga în gura mare: ”știați că tovarășul cutare a avut un unchi țărănist? Să fie dat afară!” Chiar contabila șefă, doamna

Moldoveanu, avusese țărăniști în familie. Dorea s-o dea afară și suferea că Profesorul nu lua în seamă ideile lui.

A acuzat, la un moment dat conducerea că face nepotisme, angajând fiii unor oameni ai zilei. I s-a explicat că principiile de lucru din acest Institut nu permit ca cineva să paraziteze pe spatele altcuiva, și că nimeni nu fusese angajat pe alte criterii decât cele profesionale. Făcea mizerie în special tinerilor din Institut. Până la urmă, Prof. Simionescu s-a supărat atât de tare, încât i-a interzis să mai intre în Institut. I s-a desfăcut contractul de muncă, deoarece ajunsese ”spaima institutului”. În consens, totuși, cu colonelul Ștefan, i s-a desființat postul, ceea ce nu era întrutotul legal, dar nu exista altă cale de îndepărtare a lui din Institut.

Până la urmă, dl. Manea ne-a dat în judecată, s-a ajuns la tribunal, unde căpitanul Manea a acuzat IBPC că ignoră criteriile partidului, iar el personal este o victimă a mentalității occidentale-americane care domina Institutul. La rândul său, reprezentantul institutului, dr. Neacșu, a spus ceva ce urechile judecătorilor nu mai auziseră până atunci: ”IBPC este o instituție deosebită, cu grade de libertate acceptate de conducerea de partid și de stat. Noi nu acordăm importanță dosarului de cadre, fiind un institut unic în Europa.”

În acest context, cine ar mai fi luat seama la plângerea unuia de care chiar securitatea dorea să se descotorosească? Și nu pentru că, din punct de vedere politic, căpitanul Manea n-ar fi avut dreptate, ci pentru că omul era ”învechit”: or, instituția ”evoluase”, folosind mijloace mai subtile de lucru. Așadar, plângerea a fost respinsă.

Un alt episod. A rămas, de asemenea, în ”memoria colectivă” a IBPC tentativa unei tovarășe bine făcute, foarte chipeșă, care a ținut să participe la o ședință de partid, prin anul de grație 1989… Atunci, după un raport obișnuit despre starea Institutului, în care fuseseră analizate aspecte punctuale, ca la un seminar științific, s-a ridicat ”invitata” de la sector și a spus, pe un ton foarte grav, cu adâncă răspundere: ”Tovarăși, dacă tovarășii profesori Simionescu vă pregătesc, după cum văd, ca oameni de știință, și nu am nimic de comentat pe această temă, ei bine, eu voi avea grijă ca fiecare dintre voi, și vă spun ”voi” pentru că vă văd tineri, să devină un propagandist al partidului, bine pregătit ideologic. Acesta e capitolul la care constat că treburile suferă în acest Institut. Poate sunteți buni la știința dumneavoastră, nimic de zis, dar nu aveți voie să neglijați pregătirea politică etc. etc.”

Peste sala încremenită, s-a ridicat atunci glasul puternic al ”păstorului”, Prof. Nicolae Simionescu: ”Ascultă, doamnă: cum îndrăznești să-i judeci pe acești tineri cu mâinile roase de acizi, care de 8 ani de zile, în fiecare

iarnă, lucrează la o temperatură de 12 grade, timp nenormat, pe un salariu de nimic și doar din pasiune? Cine îți dă dreptul să faci aprecieri despre cunoștințele lor, fie și în domeniul politic?" Acea ședință a rămas de pomină; tovarășa cea drăguță și-a strâns foile cu însemnări și a părăsit încăperea. Toată lumea s-a așteptat la represalii, dar nu s-a întâmplat nimic. Cineva acolo sus, dar nu prea sus, a vegheat, totuși, asupra IBPC…

Contribuțiile stiințifice ale lui Nicolae și ale Mayei Simionescu definite de marele lor mentor, George Emil Palade și de marele savant și prieten american, Guido Majno

Profesor George Palade. "În primii ani (de la înființarea IBPC, n.a.), lucrurile păreau să meargă fără dificultăți. Nicolae și Maya au organizat o excelentă echipă de lucru în România și au putut să sosească la timp la Yale, pentru a-și îndeplini obligațiile ca profesori asociați (*visiting professors*). Amândoi s-au dovedit a fi excelenți dascăli în laborator, cât și în sălile de curs. Mai mult decât atât, studiile experimentale la Yale s-au îndreptat în direcții noi, interesante și promițătoare. Au fost descoperite microdomenii diferențiate pe aspectul luminal și aluminal al plasmalemei endoteliului fenestrat și continuu, folosind ca probe feritina cationizată, în care aceste diferențieri au fost identificate în urma tratamentelor cu enzime specifice."

Elementul cel mai important în aceste noi descoperiri a fost faptul că aceste microdomenii diferențiate chimic corespundeau unor elemente structurale bine definite. Mai mult, rezultatele au sugerat clar că veziculele plasmalemale au compoziția chimică de suprafață necesară pentru a transporta proteine plasmatice, cunoscute ca fiind în majoritatea lor specii de tip anionic. Proiectul privind domeniile microdiferențiate a fost un alt exemplu de activitate dusă la bun sfârșit prompt și cu mare eficiență de către Nicolae și Maya Simionescu. La Universitatea Yale și la IBPC, proiectul acesta a fost aprofundat și extins și la alte tipuri de endotelii. Același protocol de bază a fost aplicat pentru localizarea receptorilor pentru histamină pe suprafața endoteliului, folosind conjugate de histamină-feritină.

* * *

Noi trasori. Ambele laboratoare au dezvoltat apoi o nouă direcție de cercetare, derivată în parte din studiul microdomeniilor diferențiate, bazată

pe ipoteza că proteinele plasmatice ar putea constitui trasori mai potriviți decât peroxidazele (folosite la acea vreme), pentru a demonstra în continuare rolul veziculelor plasmalemale în schimburile dintre plasmă și fluidele interstițiale. Erau necesare, însă, noi metode pentru a evidenția acești trasori mai puțin problematici și mai fiziologi. Primul pas important făcut la IBPC a fost localizarea preluării lipoproteinelor de joasă densitate de către veziculele plasmalemale ale endoteliului vaselor mari ca și de acela din *vasa vasorum*. Descoperirea a prezentat o deschidere nouă spre vastul domeniu al aterosclerozei și bolilor cardiovasculare, domeniu care a devenit în anii următori scopul major al eforturilor de cercetare din IBPC.

Al doilea pas important a fost introducerea complexelor de aur coloidal-albumină ca trasori care puteau fi identificați individual în specimene microvasculare, bine prezervate morfologic. Activitatea aceasta s-a desfășurat în paralel la Yale și la IBPC, dar Nicolae și Maya Simionescu, susținuți de colaboratori competenți, au avansat mai repede și au diversificat investigațiile incluzând, în afara albuminei simple, albumina glicată și complexele de albumină-acizi grași- în repertoriul proteinelor folosite pentru cuplarea cu particule de aur coloidal. De data aceasta, rezultatele erau deasupra oricăror dubii. Toți acești trasori erau preluați de către veziculele plasmalemale și descărcați de ele pe partea opusă a endoteliului, printr-un proces pentru care Nicolae Simionescu introdusese deja termenul de transcitoză. Validitatea vechii ipoteze, a transportului prin vezicule plasmalemale a fost în mod convingător stabilită de noile rezultate, dar aspecte importante, deși subsidiare, rămăseseră fără răspuns. Toate complexele albumină-aur reprezentau probe exclusive pentru ipoteticul sistem al porilor mari: din punct de vedere fiziologic, sistemul porilor mici era mai important. Mai mult, complexele reprezentau probe experimentale și interacția lor cu endoteliul nu era în mod necesar aplicabilă și albuminei monomerice. Acestei probleme i s-a dat în final un răspuns în laboratorul de la Yale, unde s-a demonstrat (imunocitochimic, folosind complexe aur-anticorpi de secțiuni fine la gheață, din inima de șoarece) că veziculele plasmalemale sunt clar implicate în transcitoza albuminei monomerice native.

Rezultatele obținute cu trasorii albumină-aur l-au îndemnat pe Nicolae Simionescu să postuleze existența unor proteine de legare a albuminei la nivelul plasmalemei endoteliale, posibil implicate în transcitoză. Cercetările ulterioare din IBPC au identificat de fapt patru proteine, dar deoarece au fost găsite, de asemenea, în multe alte tipuri celulare, altele decât cele endoteliale, rolul lor funcțional urmează a fi elucidat prin noi cercetări experimentale.

* * *

Recunoașterea mondială. În decada începând cu 1980, Nicolae și Maya Simionescu au ajuns să fie recunoscuți pe plan mondial, ca lideri în cercetarea endoteliului vascular și IBPC a fost considerat unanim ca un important centru de avangardă în acest domeniu. Ambele poziții au fost consolidate în continuare de cercetările modificărilor incipiente care afectează peretele vaselor mari, susceptibile de a dezvolta leziuni ateromatoase. Recunoașterea largă s-a materializat în invitații ca profesori asociați (*visiting professors*) la Universitățile McGill, Columbia și la Universitatea din California, la Los Angeles, și de asemenea în invitații de a participa, practic vorbind, la toate conferințele asupra endoteliului, organizate pe ambele maluri ale Oceanelor Pacific sau Atlantic.

În termeni practici însă, cel mai important semn al recunoașterii mondiale au fost cele trei granturi (timp total de 9 ani) acordate NIH, pentru IBPC, la solicitarea lui Nicolae Simionescu. Au fost și singurele granturi acordate unui institut de cercetare din Europa de est, într-o perioadă în care granturile acordate unor institute din afara SUA reprezentau doar un foarte mic procent din total. Aceste granturi au făcut posibilă achiziționarea de chimicale și echipamente de pe piața vestică și organizarea de simpozioane internaționale la IBPC pe teme de interes general în biologia endoteliului, inclusiv transcitoza proteinelor și lipoproteinelor și rolul lor în dezvoltarea leziunilor aterosclerotice. La aceste conferințe au participat cercetători americani de înalt prestigiu din fiecare domeniu menționat mai sus, în acele vremuri conferințele acestea fiind printre puținele ocazii în care tinerii cercetători români din IBPC și alte instituții au avut posibilitatea de a se întâlni cu ”nume” de care aflaseră în revistele științifice și de a purta discuții cu ei.

La sfârșitul decadei 1980, dificultăți diferite au început să-și facă apariția la orizont. Întâi, autoritățile române au devenit din ce în ce mai reticente în acordarea vizelor de ieșire din țară pentru Nicolae și Maya Simionescu. Nu se mai putea conta pe sosirea lor la timp pentru perioada celor trei luni la Yale University. În fine, tinerii membri ai laboratoarelor începuseră să piardă din vedere rațiunile acordurilor inițiale. IBPC nu mai era considerat un Institut în dezvoltare, ci un competitor matur și eficient. Ceea ce înseamnă, de fapt, că experimentul inițial și cel mai important, care fusese crearea IBPC-ului, reușise pe deplin. În final, guvernul român a refuzat prelungirea convenției de colaborare.

Contribuții generale la literatura științifică. Nicolae Simionescu iubea activitatea de dascăl și avea un dar deosebit de a organiza și sistematiza informația științifică. Acest talent l-a folosit cu succes la redactarea împreună cu Maya Simionescu a unor capitole din tratate

americane de histologie, a unor lucrări de sinteză asupra organizării și funcționării endoteliului și, de asemenea, la editarea a două volume succesive, deosebit de utilizate, asupra funcțiilor normale și disfuncțiilor celulei endoteliale.

Cercetarea în ateroscleroză. În prima parte a anilor 80, Nicolae Simionescu a inițiat în IBPC, o direcție de cercetare cu totul nouă, ca răspuns la importantele descoperiri rezultate în studiul particulelor lipoproteice și dezvoltării leziunilor aterosclerotice, făcute în alte laboratoare. Undeva, în adâncurile spiritului lui, exista un profund și constant interes pentru patologia experimentală, care acum ieșea la suprafață cu o forță suficient de puternică pentru a deveni una din liniile dominante de cercetare în IBPC. Această direcție de cercetare a produs un nou model experimental, hamsterul cu leziuni ateromatoase induse printr-o dietă bogată în lipide și colesterol. S-a concentrat asupra modificărilor incipiente care preced leziunile ateromatoase observabile: a demonstrat că hipercolesterolemia determină modificări în chimia suprafeței endoteliului și a intimei arterelor susceptibile la ateroscleroză și, de asemenea, a evidențiat că lipoproteinele, apolipoproteinele și liposomii (descoperite la IBPC) se acumulează în matricea extracelulară a intimei. Acești liposomi (lipoproteine modificate) au fost izolați și parțial caracterizați. Prezența lor a fost inițial o surpriză în patologia vasculară, dar mai târziu aceste lipoproteine modificate și acumulate extracelular în peretele arterelor au fost detectate și de alte grupuri implicate în cercetarea aterosclerozei experimentale.

La Columbia College of Physicians and Surgeons. La începutul anilor ‘90, Nicolae și Maya Simionescu, menținând legătura lor cu Universitatea Yale, au inițiat o colaborare susținută cu cercetători (Samuel Silverstein și David Stern) din Departamentul de Fiziologie al Universității Columbia. O parte din activitate s-a concentrat în continuare asupra modificărilor endoteliale din ateroscleroza incipientă și asupra localizării receptorilor endoteliali pentru produșii de glicare avansată a proteinelor sanguine, un aspect de o deosebită importanță în complicațiile cardiovasculare ale diabetului. O altă parte a fost realizarea unei proceduri reușite, ingenioase și interesante de radioiodinare a proteinelor veziculelor plasmalemale folosind complexe aur-albumină suplimentate cu lactoperoxidază urmată de substanțele cerute pentru radioiodinare. Metoda este de mare actualitate, dată fiind intensitatea interesului în biochimia caveolelor (o altă denumire dată veziculelor plasmalemale).

IBPC după 1989. Căderea regimului comunist la sfârșitul anului 1989 a permis ca numeroase idei, dorințe și inițiative îndelung aflate în așteptare, să iasă la suprafață ca parte a unui sindrom general de

eliberare a comprimării. La IBPC, rezultatul a fost că mulți dintre tinerii cercetători au plecat în căutarea unor noi posibilități de afirmare în străinătate, în Franța, Germania, Anglia și Statele Unite. Majoritatea prestează o activitate de înaltă calitate și găsesc poziții bune în cercetarea științifică, mulțumită experienței dobândite în IBPC, alături de Nicolae și Maya Simionescu. În același timp, IBPC a reușit deja să recruteze și să pregătească o nouă generație care promite să fie la fel de bună, dacă nu chiar mai bună decât prima.

Academia Română. În 1990, Nicolae și Maya Simionescu au fost aleși membri corespondenți ai Academiei Române. În 1991, au devenit membri plini și în 1994, Nicolae Simionescu a fost ales vicepreședinte al Academiei Române. A acceptat aceste noi responsabilități cu sentimentul că are misiunea de a îmbunătăți condițiile și nivelul de susținere al cercetării fundamentale aplicate în științele biomedicale din România. A considerat că ceea ce este valabil și a reușit în organizarea sistemului de cercetare științifică din țările vestice trebuie avut în vedere și, dacă este posibil, adaptat necesităților comunității științifice românești și realităților economice din România.

* * *

Profesor Guido Majno. ”Nicolae Simionescu a ales să concentreze activitatea întregului Institut asupra unei singure probleme: biologia celulară și moleculară a sistemului cardiovascular, în particular, a endoteliului și a rolului său esențial în patologie, anume ateroscleroza. A fost o alegere inspirată, nicăieri în lume nu mai există un grup atât de puternic capabil să abordeze ateroscleroza din atâtea puncte de vedere ale biologiei celulare, incluzând biochimia, biofizica, fiziologia, patologia, culturile de țesuturi și microscopia electronică. Timpul a dovedit că Nicolae Simionescu a ales soluția cea mai bună (chiar dacă a trebuit să lupte cu foarte mari dificultăți, cum ar fi instabilitatea tensiunii electrice, fapt care a făcut ca microscopia electronică să fie impracticabilă o perioadă destul de lungă). Curând, Institutul a produs rezultate științifice care au avut rezonanță în întreaga comunitate științifică, în orice discuție despre ateroscleroză, vase sanguine și endoteliu, nimeni nu se putea considera informat la zi, fără a fi la curent cu ultimele descoperiri ale lui Nicolae și Maya Simionescu și ale colectivului lor.

Printre realizările științifice ale lui Nicolae Simionescu și ale asiduei sale echipe, vom menționa doar câteva, deosebit de importante:

Demonstrarea definitivă, împreună cu G.E. Palade, a faptului că permeabilitatea endoteliului variază atât de-a lungul întregului arbore vascular, cât și la nivelul unei singure celule endoteliale.

Evidențierea faptului că celula endotelială prezintă receptori pentru albumină, pe care aceasta îi folosește în transportul transendotelial al acestei proteine - o descoperire care a fost considerată ca fiind cea mai importantă adusă fiziologiei endoteliului de la descoperirea legii lui Starling sau, mai bine spus, de când George E. Palade a demonstrat existența transportului vezicular.

Demonstrarea faptului că receptorii pentru histamină sunt concentrați în special în venule – spre deosebire de arteriole și capilare, explicând topografia predominant venulară a creșterii permeabilității vasculare în inflamație, un fenomen care i-a intrigat pe patologi aproape un secol.

Descoperirea faptului că primul fenomen demonstrabil în ateroscleroză este pomparea lipidelor de către endoteliu în spațiul subendotelial, observație care a fost publicată în revista American Journal of Pathology, și oferind o perspectivă cu totul nouă în ateroscleroză.

Introducerea denumirii de transcitoză a fost o idee genială. Conceptul de transport transendotelial prin vezicule plasmalemale a fost propus de către George Palade cu 30 de ani în urmă, dar, din motive greu de înțeles, a întâmpinat o rezistență considerabilă. Nicolae Simionescu i-a atribuit o denumire care, revelând semnificația generală, a determinat ca aproape imediat fenomenul să fie acceptat ca o realitate. Legat de acesta, conceptul de transcitoză mediată de receptori a fost introdus de către Nicolae Simionescu.

Trebuie, menționate aici și monografiile asupra endoteliului normal și patologic editate de Maya și Nicolae Simionescu, care au devenit referințe bibliografice de bază".

Notă: Guido Majno este Profesor la University of Massachusetts, Worcester, SUA.

CA O FLACĂRĂ ÎN VIAȚA CETĂȚII
SOCIETATEA NAȚIONALĂ DE BIOLOGIE CELULARĂ (SNBC)
SAU RENUNȚAREA LA ”IMUNITATE”

Pe lângă activitatea de cercetare propriu-zisă, prezența lui Nicolae Simionescu în viața cetății științifice a țării sale și a lumii rămâne, de asemenea, o componentă importantă a moștenirii rămase de la marele savant. Împărțindu-și timpul între nesfârșitele ore de laborator (unde lucra intens, la cot cu stagiarii) și călătoriile peste Ocean, la capătul cărora îl așteptau lungi cursuri la Yale University, folosind fiecare minut pentru a găsi noi soluții de supraviețuire a IBPC, citind enorm (200-300 pagini zilnic), organizând workshop-uri și seminarii de înaltă ținută, sărbătorindu-l pe Eminescu, ținând toate marile sărbători tradiționale, lansând”provocări” turistice și audiții muzicale, sărbătorindu-i pe fiecare din cei 100 de angajați de ziua lui etc., având, deci, înaintea ochilor un astfel de ”evantai agitat”, de fapt, un astfel, mod de a trăi, te întrebi cu îndreptățire: când a mai avut Nicolae Simionescu timp să se implice în viața științifică din afara IBPC?!

A trăit în ”marea agitată a îndolierilor”, cum însuși spunea în septembrie ‘89, ”cu strădanii reușite alături de încercări nereușite”. ”În toată această luptă, dintre bucuria succeselor și amărăciunea eșecurilor, principalul instrument de conservare rămâne pasiunea”.

Așadar, răspunsul la întrebarea de mai sus îl dă chiar Profesorul: este vorba de pasiune. Crezul său fierbinte este rezumat în câteva versuri simple, incandescente, versuri-pasiune:

Dacă eu nu ard.

Dacă tu nu arzi,

Dacă noi nu ardem,

Cum oare beznele

Vor deveni lumină?

”Profesorul ardea, își amintea o colaboratoare, dna Anca Sima, ne lumina, ne încălzea și ne susținea”. Ca urmare, fiind convins că și în alte

centre universitare ale țării erau mulți tineri interesați de biologia celulară, Profesorul a găsit forma de a-i organiza și pe ei în același ”flux diversionist”, pentru puterea de atunci, al cercetării fundamentale, al științei pure (e de notat că savantul avea deja în vedere și crearea unei școli de biologie moleculară – știință aflată deja într-o accelerată dezvoltare pe plan mondial).

Pentru că toate strădaniile lui generoase trebuie să aibă un nume, a creat Societatea Națională de Biologie Celulară (SNBC), fondată în luna mai 1982. Pornind cu un număr de 20 de entuziaști de la IBPC, în câteva luni s-au înregistrat 150 de înscrieri din toată țara. Astăzi, SNBC are peste 400 de membri, fiind una dintre cele mai puternice societăți științifice din România.

Mottoul începuturilor a fost, de asemenea, în răspăr cu gândirea oficială a acelor vremuri. Plecând de la motivația ”tribunalului revoluționar” care l-a condamnat în 1794 pe Lavoisier la ghilotină (”La Republique n’a pas besoin de savants”), Profesorul a lansat provocarea: ”La Republique a besoin de savants!” ceea ce a însemnat o atenționare transparentă adresată cabinetelor obscurantiste ale puterii comuniste.

Dacă au fost unii care, din gelozie, ignoranță sau rea-credință, au afirmat că lui Nicolae Simionescu ”îi dă mâna” să pară dizident la adăpostul unei ”oficine americane”, protejat de ”scutul dolarilor”, crearea SNBC marchează ”ieșirea în cetate” a Profesorului, renunțarea la ”imunitate” și lansarea în Agora, a cruciadei contra nepăsării – arma ”de distrugere în masă” a regimului, apanaj al ”omului nou” prelungit, din nefericire, până în zilele noastre…

”Comunitatea noastră științifică, spunea profesorul la sesiunea SNBC-Craiova, în 1986, este formată din oameni cărora le pasă, care n-au fost atinși de ceea ce unii numesc forma inferioară a libertății: nepăsarea”. Nicolae Simionescu a avertizat lumea științifică asupra rolului Societății: ”Noi nu avem nevoie de încă o societate, ci de una care să vrea și să poată efectiv reprezenta un mijloc eficace de a ajuta dezvoltarea cercetării biomedicale și învățământului biologic și medical”.

Departe de limba de lemn a vremii. Ca om al faptelor, Profesorul n-a iubit prea mult cuvântările. Dacă a fost nevoit, uneori, să ia cuvântul, s-a achitat, totuși, cu brio de această îndatorire, uimind auditoriul printr-un limbaj nou, proaspăt, departe de ”limba de lemn” practicată atunci pe scară largă. Dintre ocaziile în care s-a remarcat și ca un orator eficient, plin de carismă, trezind interesul audienței tocmai prin stilul direct și la obiect, se disting ședințele Societății Naționale de Biologie Celulară. Iată cum vorbea Nicolae Simionescu, omul care avea întotdeauna de spus ceva semenilor săi, oamenilor de știință.

1982 – Sesiunea de Înființare a SNBC - București

”Stimați colegi,

Să înțelegem obligația ce ne revine de a lăsa generațiilor viitoare un început de drum. Ne obligă exemplele iluștrilor cărturari români, care în vremuri totdeauna grele, au reușit să promoveze știința și cultura. Societatea noastră trebuie să fie a unor oameni curajoși, demni și neabătuți în dorința de a face ceva bun pentru țara noastră”.

1985 - Sesiunea SNBC, Târgu Mureș

”Stimați colegi,

Am avut întotdeauna profundul sentiment că a putea cerceta minunata lume a moleculelor și a celulelor este un privilegiu. Suntem beneficiarii unui efort de 300 de ani în care cercetători remarcabili au făcut vizibilă invizibila lume a celulelor și moleculelor… Din ce în ce mai mult, biologia celulară devine, dintr-un răsplătitor efort și confort intelectual, o mare răspundere socială…

Văzând cât talent, dăruire și suflet au pus în admirabila organizare a acestei sesiuni (a III-a Sesiune a SNBC) colegii noștri din Târgu Mureș, putem spune cu liniște și încredere că țara noastră nu are doar oameni de știință, ci oameni de știință cu suflet.

Nu se poate construi nimic durabil, dacă în materialul de construcție nu este adăugat ”quantum satis” suflet. Fără dăruire, nu poți deveni niciodată ceea ce admiri. În condițiile care nu sunt ușoare, Societatea noastră trebuie în continuare să pună la baza dezvoltării ei, alături de știință, suflet și patriotism. Astfel, vom putea privi cu optimism spre anii ce vin”.

1986 - Sesiune SNBC - Craiova

”Stimați colegi,

Mai importante decât cifrele, sunt legăturile stabilite între membrii Societății. Să folosim și această sesiune pentru o mai bună cunoaștere reciprocă, mai adânc respect al muncii fiecăruia, în special a celor care o fac în condiții mai grele. În deschiderea lucrărilor, vreau ca în limba strămoșilor noștri latini – care se pare că au existat pe aceste meleaguri chiar înaintea oltenilor – spre mai binele științei românești, spre mai buna ei apreciere dinăuntru și dinafară, să urăm Societății de Biologie Celulară: ***vivat, crescat, floreat***!”

1989, Sesiune SNBC la Constanța

”Stimați colegi,

Societatea noastră, cu cei peste 460 de membri de diverse specialități, ilustrează strălucit evantaiul multidisciplinar caracteristic biologiei celulare. O componentă prețioasă o constituie grupul de membri susținători, familia lărgită a societății pe care-i salutăm cu toată căldura…

În epoca în care trăim, activitatea Societății Naționale de Biologie Celulară este o briză de cultură, un act de patriotism: dar patriotism înseamnă în cazul nostru știință mai multă și mai bună.

Nu sunt vremuri simple, dar avem un optimism activ. Și să fim animați de sentimentul că prin această societate, împreună am făcut să încolțească o mică floare, asemenea Micului Prinț care își uda zilnic floricica pe care o sădise pe mica lui Planetă. Și noi să îngrijim floarea noastră în năzuința că va deveni perenă, și nu numai să o îngrijim, ci și s-o protejăm, pentru că, așa cum spunea anticul Ovidiu: ***”Felix qui, quod amat, defendere fortiter audet”*** (Fericit cel ce cutează să apere cu putere ceea ce iubește).

1994 – Sesiune SNBC – Constanța

”Stimați colegi,

Am considerat întotdeauna Societatea noastră drept un rar grup select de profesioniști care, în loc să îngroașe rândurile diasporei, au înțeles să-și unească forțele și năzuințele pentru ca împreună să asigurăm supraviețuirea Biologiei Celulare și cercetării fundamentale românești.

Acum 9 ani (1985), ne-am adunat tot în acest auditorium. Era în plină perioadă de brutal anti-intelectualism pe care am avut curajul – și nu fără urmări – de a-l demasca evocând soarta lui Lavoisier. În acești ultimi ani, țara noastră a trecut prin zbuciume și jertfe, ca oameni de știință suntem liberi să ne ducem unde vrem să spunem ce vrem, să colaborăm cu cine vrem. Și totuși, aceste evidente câștiguri nu ne sunt de-ajuns. Și, fără a însemna că ne lamentăm, trebuie să spunem pe nume condițiilor de viață foarte grele și facilităților de lucru nesatisfăcătoare.

Desigur, nu mai trăim vremuri ca acelea ale lui Lavoisier, dar, din păcate, știința în România nu a ajuns la statutul pe care-l merită, deoarece sunt unii care, din incompetență, ignoră știința și pe cei care o slujesc. Mai mult, alții contestă rolul cercetării, îndeosebi a celei fundamentale în progresul socio-economic, în felul acesta condamnând ceea ce nu înțeleg. De aceea, în aceste vremuri, comunitatea științifică trebuie să iasă din pasivitate și să-și impună punctele de vedere pentru

a schimba mentalitatea organelor de decizie.

Democrația nu înseamnă populism și politicianism declarativ. Democrația implică competență și responsabilitate. În Bugetul de Stat, încă nu există o felie definită pentru știință și în mod special, pentru cercetarea fundamentală. Încă birocrații ne cer să scriem pe foile de deplasare că mergem la ”ședințe de lucru”, nu că participăm la un congres. Datorită unui complex de motive, cercetarea în România nu atinge decât în puține domenii performanțele la care o îndreptățește potențialul intelectual al acestei țări. Îmbunătățirea cercetării științifice reclamă unele reconsiderări în mentalitate, management, structura instituțională, mecanisme financiare etc. Dacă nu facem un efort să modernizăm și să revitalizăm cercetarea științifică, fără voia noastră vom fi părtași la pericolul grav al perpetuării și adâncirii decalajelor tehnologice și de competitivitate ale României și prin asta la pierderea identității patrimoniului intelectual românesc, în cadrul comunității științifice internaționale.

Modernizarea condițiilor de lucru și asigurarea nivelului de trai corespunzător misiunii sociale a omului de știință este cel mai bun remediu al ”brain-drain” -ului pentru prevenirea căruia, din păcate, nu se întreprinde nimic.

Desigur, suntem conștienți că România trece printr-o profundă criză economico-socială, dar în cadrul ei cea mai gravă este criza științei și culturii și incertitudinea supraviețuirii școlilor și a centrelor de excelență. De aceea, este esențială luarea urgentă de decizii politice care să ateste concret că și într-o perioadă de declin economic sprijinirea cercetării fundamentale este o datorie morală a Statului. Investiția constantă în Științele de bază și în formarea noii generații de scientiști este cea mai lucidă și mai sigură investiție în viitor…

Să nu uităm că Adevărul Mărunt se exprimă prin vorbe, în timp ce Adevărul Mare se exprimă prin fapte. Deci, hai la treabă!”

1989 - Iunie „Mihai Eminescu – Un secol de nemurire”

Îl întreabă un lider de Sindicat: Ce rost are comemorarea a 100 de ani de la moartea lui Mihai Eminescu la un Institut de cercetare?

Răspunsul prof. Nicolae Simionescu

Stimaţi oaspeţi, stimaţi colegi,

În primul rând, vreau să vă exprim întreaga gratitudine pentru prezenţa

Dumneavoastră aici. V-am invitat pentru ca împreună să creăm şi să împărţim momentele de încântare şi meditaţie pe care le poate genera comemorarea unui unicat cultural de profunzimea şi complexitatea "fenomenului Eminescu". A comemora (a ne aminti împreună) pe Eminescu, nu este numai un act de pietate şi un câştig în înţelegerea valorilor culturale care definesc poporul român, ci şi un prilej să reînvăţăm a stima şi iubi valoarea.

Când ne-am propus să-l comemorăm pe Mihai Eminescu, cineva m-a întrebat cu oarecare nedumerire cam aşa "Ce are Eminescu cu un institut de cercetare ?!" Dânsului nu am avut răgazul să-i explic, dar astăzi simt nevoia, şi vă cer îngăduinţa să exprim unele gânduri despre ce rost are comemorarea lui Eminescu în Institutul nostru, gânduri care, de fapt, ating o problemă mai generală despre locul şi rolul culturii în viaţa unui Institut de cercetare.

Un cunoscut profesor de biologie celulară şi erudit istoric al cercetării experimentale, Frederick Grinnell defineşte astfel ştiinţa: "Ştiinţa reprezintă multe lucruri: este un mod de a gândi şi o activitate a unor indivizi în laborator, o instituţie elaborat structurată care îşi recrutează şi educă membrii, în esenţă este un segment sensibil, interactiv şi integrat al culturii şi societăţii moderne".

De la conceperea lui, Institutul nostru a fost gândit ca o instituţie de cultură în care se lucrează ştiinţă. Această concepţie avea la bază două idei general acceptate. Prima: ştiinţa este parte a culturii, iar a doua: cultura înseamnă deopotrivă trei lucruri: creaţie, asimilare şi transmitere de valori. În fond, acest mod de a concepe un Institut, pune, la o scară foarte restrânsă, problema generală a rolului culturii în formarea unui om de ştiinţă. Istoria ştiinţei arată că un cercetător poate ajunge la o exprimare deplină a personalităţii lui creatoare atunci când este sensibilizat prin cultură. Pe plan individual, este problema relaţiei între creatorul de artă şi receptorul (nu receptorul celular) om de ştiinţă.

Orice receptor este un potenţial creator, deoarece însăşi asimilarea unei valori literare sau artistice poate conţine componente ale unui act autonom de creaţie. Această faţetă a relaţiei cultură-ştiinţă dă un sens mai complex cunoscutului *Homo Cogitans - Homo Significans*. Cu aceste idei în minte, iată-ne acum 10 ani, la începutul activităţii Institutului, înconjuraţi de un grup de tineri - foarte tineri - deosebit de înzestraţi şi entuziaşti. De la început, noi cei doi "seniori", am avut sentimentul responsabilităţii de a le asigura aici nu numai aparate, chimicale şi cărţi, ci şi condiţii pentru o formare complexă, în care să se îmbine armonios un înalt profesionalism cu o largă şi nesaturată deschidere spre mesajele perene ale culturii.

Această deschidere este însăşi un element definitoriu al tinereţii, pe care o formulează admirabil George Enescu în eseul intitulat "A fi tânăr": "Rămâi tânăr atâta vreme cât rămâi receptiv la tot ce este frumos, bun şi mare, la mesajele Naturii, Omului şi Infinitului". Şi atunci, ca şi acum, am fost profund convinşi că, mai mult ca oricând, ţara noastră are nevoie nu numai de buni tehnologi, ci şi de creatori de ştiinţă sensibilizaţi şi fertilizaţi prin cultură. Din astfel de oameni ies marii patrioţi. În acei ani de început ai Institutului, fascinaţi şi preocupaţi de aparate sofisticate şi proiecte de cercetare, de rezultate noi sau eşecuri amărui, ne-a rămas relativ puţin timp pentru cultură. Totuşi, aproape zilnic, în orele de răgaz, se ascultă muzică clasică, se poate examina elaborata cartă a Istoriei Civilizaţiei Universale (probabil unica în ţară) în faţa aforismelor lui Pasteur, Babeş, Einstein, alături de cele ale lui Brâncuşi, Enescu sau Montaigne.

Ca biologi, am înţeles foarte bine că aşa cum unele vieţuitoare trăiesc în apă sau aer, omul trăieşte în cultură, acel "ceva" dincolo de binele sau răul cotidian. Dar, tot ca biologi, ne-am dat seama că în lumea contemporană (deseori "o lume ca nelumea"), aşa cum toate mediile naturale sunt poluate şi cultura poate fi poluată. De aceea, cred că este oportun să vorbim azi de o ecologie a culturii la care avem datoria de a participa activ pentru identificarea şi combaterea surselor de poluare şi gravelor efecte pe care le pot avea asupra purităţii şi viabilităţii moştenirii spirituale pe care o transmitem viitoarelor generaţii. Acum, după un deceniu de activitate, Institutul şi-a propus să treacă la o nouă etapă, aceea a organizării şi asimilării directe a unor acte de cultură. Prin asta nădăjduim să cultivăm în rândul tineretului nostru şi cel de-al 3-lea parametru al culturii, anume responsabilitatea pentru transmiterea de valori, emanată din stima pentru valoare.

Pentru orice societate, inclusiv a noastră, progresul depinde de capacitatea de a forma "masa critică" de oameni demni, capabili şi fermi să orânduiască natural scara valorilor, împotriva poluantei non-valori. O comunitate ştiinţifică priveşte spre viitor, inclusiv acest mic şi modest Institut, este vital interesată, nu atât în a redefini "lumea ca nelumea", şi nici de a-i separa (aşa cum spune Eminescu) pe "smintiţi şi pe mişei", ci în primul rând în a identifica, promova şi ocroti acele realităţi care poartă în ele permanenţa spiritului şi geniului creator al poporului nostru. Asta implică să urâm apatia şi această comemorare este o luptă împotriva apatiei, pentru că - aşa cum spunea un celebru gânditor: "Nepăsarea este treapta cea mai de jos a libertăţii".

Iată ce rost are în Institutul nostru comemorarea lui Mihai Eminescu, acest "om deplin al culturii româneşti", cum îl numea Constantin Noica. Omul care, în numai 15 ani de creaţie, ne-a dăruit alături de o inegalabilă

poezie, peste 14 000 de file de manuscris adunate în 44 de caiete. După opinia specialiştilor, acestea sunt comparabile poate doar cu caietele lui Leonardo da Vinci şi Paul Valery, fiecare dintre ei beneficiind de aproape o jumătate de secol de creaţie.

De ce sunt atât de importante pentru noi caietele lui Eminescu? Pentru că ele reflectă o imensă sete de cunoaştere pentru tot: filozofie, filologie, economie, istorie etc. Şi deşi Eminescu nu şi-a luat Doctoratul - caietele lui conţin zeci de pagini de adnotări de biologie, chimie, fizică, matematică. Comemorându-l pe Eminescu, reiterăm îndemnul, adresat îndeosebi tineretului nostru, pentru încredere în geniul creator al poporului român şi năzuinţa activă spre o formare complexă.

Nevoia ţării noastre de aşa ceva este admirabil exprimată de Nicolae Iorga, care definea astfel pe Eminescu şi societatea din vremea lui; citez, şi cu aceasta închei: "Un om complet, într-o vreme în care ceea ce este cel mai necesar pentru noi este această refacere a omului complet, pe care timpurile noastre l-au sfărâmat în fragmente, distrugând omenirea în însăşi esenţa ei iniţială şi definitivă"

Societatea noastră, cu cei peste 460 de membri de diverse specialități, ilustrează strălucit evantaiul multidisciplinar caracteristic biologiei celulare. O componentă prețioasă o constituie grupul de membri susținători, familia lărgită a societății pe care-i salutăm cu toată căldura…

În epoca în care trăim, activitatea Societății Naționale de Biologie Celulară este o briză de cultură, un act de patriotism: dar patriotism înseamnă în cazul nostru știință mai multă și mai bună.

Nu sunt vremuri simple, dar avem un optimism activ. Și să fim animați de sentimentul că prin această societate, împreună am făcut să încolțească o mică floare, asemenea Micului Prinț care își uda zilnic floricica pe care o sădise pe mica lui Planetă. Și noi să îngrijim floarea noastră în năzuința că va deveni perenă, și nu numai să o îngrijim, ci și s-o protejăm, pentru că, așa cum spunea anticul Ovidiu: "*Felix qui, quod amat, defendere fortiter audet*" (Fericit cel ce cutează să apere cu putere ceea ce iubește).

* * *

Vom reține că îndemnul de mai sus nu vine de la un politician ajuns peste noapte, grație Revoluției, la Tribuna Parlamentului. Condamnarea și grija față de "scurgerea creierelor" peste hotare nu este opera demagogică a unuia care s-a trezit apărător al "valorilor naționale" după 1989. Atât în '79, în '82, în '89 cât și în '94. Nicolae Simionescu are același discurs, același comportament responsabil și patriotic. El este dintre puținii care nu s-au

refugiat din calea furtunii, ci s-a întors cu bărbăție să dea piept cu ea, a ales de bunăvoie și în perfectă cunoștință de cauză să stea în miezul turbulenței, să lupte din interior, să-i slăbească furia punând-i drept pavăză verticalitatea morală, devotamentul pentru o idee, sinceritatea și credința în triumful adevărului.

Pentru convingerile și lupta sa în arena științei adevărate, 1989 nu este un an de grație, ca pentru atâția alți români. El nu a trebuit să se ”schimbe la față”, să-și retușeze biografia după modelul atâtor și atâtor politicieni. Nu a avut a ascunde nimic compromițător, nici în fața familiei, nici a colegilor, nici a comunității științifice. Nu a fost nevoit să intre în ”cor” (se poate citi ”partid”), pentru a-și ascunde falsetele din voce și a-și pierde urma la umbra unei sigle, cum au făcut majoritatea oamenilor vechiului regim.

Nicolae Simionescu a ieșit din infernul comunist ca un soldat din tranșee, iar nu ca un general din buncărul de comandă, cu uniforma scrobită și îngreunată de decorațiile carierismului.

El a venit în ”democrația-pentru-toți” dintr-o ”democrație mai mică”, numită IBPC. Cum ar spune poetul, a venit ”cu ochi halucinați și mistuiți lăuntric”, căci în universul creat cu atâta dăruire și luptă, el ”a văzut idei”. Acesta este, probabil, marele mister pe care nici G. E. Palade, nici americanii n-au reușit să-l înțeleagă, atunci când îl criticau pentru decizia de a se întoarce la București. Ideile ”văzute” de Simionescu se developează într-o operă consistentă și originală în știința secolului nostru.

ACADEMIA ROMÂNĂ
PROPUNERI DE REFORMĂ A CERCETĂRII

Când a fost ales membru și apoi vicepreședinte al Academiei Române în 1991, respectiv 1994, Nicolae Simionescu s-a văzut confruntat cu o lume conservatoare, ”încremenită în proiect”. Și-a dat seama imediat că schimbări profunde se cer întreprinse în venerabila instituție abătută din calea ei firească de vicisitudinile vremurilor. Încurajat de cei mai vizionari ”nemuritori” ajunși, din fericire, la conducerea executivă, Profesorul cosmopolitan de la IBPC a lansat programe noi, adevărat revoluționare. Campania sa, destul de prost văzută de ”unii savanți” câți vor mai fi fost încă activi la acea dată, a debutat cu un discurs incendiar ținut în Marea Aulă, dedicat Formării Elitei – ca un singur mod de obținere a performanțelor de vârf, iar de aici, de obținere a subvențiilor. Fiori reci vor fi trecut pe spinarea multor abonați ”din oficiu” la subvenții, care nu aveau de făcut decât să semneze condica zilnic și, eventual, să întocmească rapoarte și bilanțuri festive.

Conceptele lansate de Simionescu păreau a veni de pe altă lume pentru unii dintre cei prezenți, cărora le-a fost greu să priceapă că omul vorbea dintr-o experiență acumulată ”în secret”, la câteva sute de metri distanță, pe ”luminosul” mal al Dâmboviței. Destui ascultători vor fi fost uimiți că a fost posibil ca cineva să dezvolte și să aplice astfel de idei sub dictatura care oprimase și veștejise totul în cale. Șocul a fost și mai mare când Profesorul a trecut de la vorbe la fapte, prezentând un plan de ”măsuri pentru îmbunătățirea cercetării științifice în Academia Română”. Plan din care, pentru edificarea cititorilor, reproducem câteva fragmente.

Managementul General

Alături de cele trei funcții actuale (for suprem de consacrare cultural-științifică; efectuarea de cercetări fundamentale și avansate; rol social-științific legat de problemele societății românești), este necesar ca Academia Română să-și adauge noi importante activități:

(1) Participarea la învățământul superior, la educația în știință a tineretului și formarea cercetătorilor.

a) Numărul mare de cercetători cu deosebită competență de

specialitate din Institutele AR (Academia Română) trebuie folosiți în învățământul universitar, spre beneficiul studenților. Aceasta se poate realiza prin cumul de funcții de profesori asociați.

b) Prin perceperea corectă a rolului covârșitor pe care știința îl va juca în mileniul trei, marile Academii și-au inclus ca obiectiv major educația în știință a populației și îndeosebi a tinerilor începând cu cei din liceu. Academia Română își poate alcătui relativ curând un program concret în acest sens, fiind una dintre acele puține inițiative care *nu costă bani*.

c) Participarea la formarea tinerilor cercetători.

(2) Finanțarea extramurală prin sisteme competitive deschise.

AR trebuie să devină una din sursele principale de stimulare a cercetărilor fundamentale de mare relevanță științifică, indiferent unde s-ar desfășura acestea. AR urmează să-și includă în buget o fracțiune destinată finanțării pe baza competiției a unor valoroase propuneri de cercetare venite din universități, institute extra-academice etc.

(3) Consultant al organismelor de stat în știință și cultură.

Așa cum se întâmplă în unele țări avansate, AR trebuie să atingă un astfel de prestigiu, încât forurile de stat să o consulte în orice acțiune care privește direct sau indirect cultura și știința românească. Consultanța ar trebui să se întindă de la elaborarea actelor normative aferente până la numirea miniștrilor de resort, atașaților cultural-științifici ai ambasadelor și ai centrelor culturale din străinătate.

Sistemul Instituțional

Prin felul în care a fost tratată de regimul comunist, AR are o istorie unică. În 1948 a fost desființată și înlocuită cu Academia Republicii Populare Române, organizată după modelul sovietic. Peste 100 de foști membri au fost excluși și înlocuiți cu unii conducători comuniști de îndoielnică valoare. Demolarea s-a definitivat în anii `60 prin desființarea Institutelor de cercetare sau înglobarea lor în sectoarele economico-industriale. Ca urmare a acestor aberații, anul 1989 găsește AR mult slăbită, în timp ce în celelalte țări centrale și est-europene, inclusiv în Rusia, academiile sunt relativ puternice. AR a trebuit refăcută fizic și moral, printr-un proces prelungit și complicat. În actuala ei structură, AR are 54 Institute și 11 Centre de cercetare (...) Întrucât actualii conducători ai unităților de cercetare (UC) și ai AR au fost numiți în funcție după 1992, s-a cerut de către un număr mare de academicieni, cât și de Federația Sindicatelor din AR, ca toate funcțiile de directori să fie scoase la concurs.

Un nou sistem de finanțare: introducerea granturilor competitive

În perioada 1993-1994, s-au făcut deja primii pași de trecere de la finanțarea instituțională globală, la finanțarea de programe. Din numeroase motive, deopotrivă obiective și subiective, această aparentă schimbare are un caracter formal, nestimulativ și ineficient, fiind în continuare grevat de nivelul extrem de scăzut al fondurilor alocate AR și cercetării fundamentale în general.

Teza după care marea performanță financiară atinsă a fost aceea de asigurare a salariilor (și acelea la un nivel vecin cu sărăcia) nu onorează nici pe oamenii de știință și nici pe cei cărora le revine obligația morală de a sprijini corespunzător cercetarea științifică a acestei țări (...)

În consecință, propunem participarea AR la înființarea Fondului Român pentru Cercetare (FRC), ca sistem autonom de granturi competitive individuale pe plan național, deschis oricărei persoane cu neliniștea creativității, indiferent în ce domeniu. Singurul criteriu decisiv pentru finanțarea unor proiecte este potențiala lor valoare științifică.

De asemenea, propunem introducerea sistemului de granturi competitive ”peer review”, cu implicarea în unele domenii și a unor specialiști străini. În această acțiune, AR trebuie să joace rolul forului metodologic.

Sistemul menționat este folosit de câțiva ani în țările din jur, în timp ce în țările cu știință avansată, de circa trei decenii. Introducerea sistemului de finanțare complexă este un alt punct al planului nostru. În acest sistem, bugetul AR ar urma să fie alcătuit din câteva componente corelate, dar cu valori și destinații specifice:

I) bugetul de bază (”core budget”), care să asigure salariile, întreținerea infrastructurilor și a echipamentelor, administrarea bunurilor existente;

II) fonduri pentru cercetarea propriu-zisă, pentru investiții și tehnică nouă, pentru materiale consumabile și pentru granturi competitive intramurale și extramurale;

III) fonduri pentru cooperări interacademice și internaționale;

IV) finanțarea indirectă (scutiri de taxe, TVA etc).

Pledăm pentru accesul cercetătorilor AR la fondul special de 1% și la orice sistem de finanțare pe bază competitivă, precum și pentru asigurarea dreptului AR de a primi donații și sponsorizări din țară și din străinătate.

Resursele Umane

Deteriorarea condițiilor tehnice de lucru plus salariile insuficiente, au efecte negative asupra atracției tinerilor spre cariera științifică. Propunem elaborarea unui program complex de formare a noii generații de cercetători, în cadrul căruia să fie introdus, printre altele, un nou sistem de burse alcătuite dintr-un fond necesar specializării în străinătate, plus un fond pentru dotarea laboratorului la care urmează să revină în țară. Un alt punct îl constituie salarizarea diferențiată și acordarea de premii și premieri conform cu performanțele științifice. Va trebui, totodată, legiferată realizarea de venituri adiționale (doctorantura, contracte, granturi, cursuri etc.).

De asemenea, se vor introduce contracte de angajare pe timp limitat, măsură prin care se asigură continuitatea fluxului și ritmului productivității științifice și disipează starea de spirit a ”angajării pe viață”.

Cooperarea Internațională

În general, participarea cercetătorilor români la variatele programe de cooperare științifică cu Uniunea Europeană este încă sub nivelul posibilităților. România ocupă o poziție minoră în cadrul relațiilor cu UE.

În timp ce numărul de proiecte COST este între 30 și 50 în Polonia, Ungaria și Cehia, România este prezentă doar cu 4 (jumătate din cota de proiecte aprobate de Bulgaria și Slovenia). În schimb, țara noastră are un număr mare de deplasări în Vest (361 în anul 1993), față de numai 244 ale cercetătorilor unguri.

Acordurile interacademice sunt absolut necesare și ele trebuie amplificate și diversificate. Dar rămâne de gândit problema eficienței acestor participări reflectate în final în producția științifică.

Propunem crearea, în cadrul bugetului AR, a unui fond special pentru finanțarea colaborărilor internaționale, care ar urma să fie alocat pe baza competiției și nu automat oricărei cooperări internaționale – adesea finanțate deja de UE.

În fine, se impune crearea, în cadrul AR, a unui Oficiu pentru Integrare în Programele de Cooperare Europene și Internaționale și organizarea în unitățile de cercetare ale AR, de doctorate și stagii de specializare pentru cercetători străini.

EXTRAORDINARUL DE FIECARE ZI
EVOCĂRI
UN POSIBIL PREMIU NOBEL

Așa cum scriam în ”Curierul Românesc” din martie 1995, prin dispariția lui Nicolae Simionescu, la 6 februarie 1995, România a mai pierdut o foarte posibilă, în viitorul apropiat, nominalizare pentru Premiul Nobel.

Descoperirile sale omologate internațional, în cadrul elaborării unor noi metode în biologia celulară, i-au adus un imens prestigiu. A fost cel dintâi care a pus în evidență modul în care debutează ateroscleroza, uneori încă din copilărie, descoperind liposomii extracelulari (lipoproteinele modificate și reasamblate) ca cea mai precoce modificare biochimică în structura vaselor de sânge.

Tot pentru prima oară, lăsând deoparte scepticismul biologilor, a reușit să izoleze celule endoteliale din inimă, adăugând această realizare la prioritățile sale intrate deja în literatura mondială: ”transcitoza” și ”transcitoza mediată de receptori”.

După cum spunea recent laureatul Premiului Nobel, prieten și coleg de generație al savantului român, (Gunter Blobel de la Rockefeller University din New York), dispariția lui Simionescu este ”o mare pierdere pentru știință. El a fost cea mai mare speranță a științei românești în era postcomunistă”.

Dar, desigur, dispariția lui Nicolae Simionescu a fost o mare pierdere nu doar pentru știință. O dată cu el, a dispărut un excelent pianist, un arhitect de mare talent, un filosof al lucrului bine făcut, un manager excepțional. Un exemplu de demnitate, ”de care biata țară avea atâta nevoie” (prof. O. Bârzu), un om mândru, dedicat familiei și prietenilor.

Evocându-i personalitatea, membrii familiei și foștii colegi și prieteni au găsit, cu ușurință, un limbaj comun : acela al durerosului regret, dar și al mândriei de a-i fi fost, într-un fel sau altul, în apropiere. Răpus de o boală neiertătoare, în chiar timpul căutărilor febrile pentru a-i afla leacul, Nicolae Simionescu, asemeni unui alt cunoscut român, Emanuil Gojdu, pare a ”erumpe” astăzi de sub lespedea mormântului, spre a constata că opera sa este continuată cu aceeași dăruire de Maya Simionescu și de colegii de la IBPC.

Ceea ce spunea Gojdu la mijlocul secolului trecut este de o frumusețe nobilă, care ar putea defini la fel de bine și posteritatea lui Simionescu, caracterul său de mare patriot. Dacă Gojdu, mare român, a lăsat în urma sa un patrimoniu și o infrastructură a mecenatului său remarcabil deschizând porțile științei pentru mulți tineri români din Imperiul Austro-Ungar, Simionescu, la fel de mare român, transmite urmașilor tot un important patrimoniu de știință și o infrastructură unică necesară cercetării în mileniul III.

Iată ”testamentul” iluminatului Mecena din Oradea: ”Laud Dumnezeirea, căci m-a crescut român: iubirea ce am către națiunea mea neîncetat mă îmboldește a stârni în faptă ca, încă și după moarte, să erump de sub gliile mormântului, spre a putea fi pururea în sânul națiunii mele”.

”Pururea în sânul națiunii” va rămâne, desigur, și Nicolae Simionescu, cel care, renunțând la o înaltă poziție peste Ocean, a ales să împartă la București, cu ceilalți români, pâinea amară a exilului intern, ”durerea neamului”, luptând contra românului devenit... lup pentru român.

Și el a fost crescut român, întru lauda Dumnezeirii; și el s-a lăsat îmboldit de iubirea către națiunea sa. De aceea, amintirile celor dragi, precum și ale colaboratorilor apropiați, aruncă o lumină plină de revelații asupra nobilului său destin.

Nicolae Simionescu este, deopotrivă, ”daddy”, ”grațiosul prim violonist”, ”Domnul Profesor”, ”puritanul”, ”doctor Si”, ” Academicianul” etc, apelative care conturează marea sa personalitate.

ELOGII – AMINTIRI – OMAGIU

Maya Simionescu, - soție: Nicolae Simionescu: prin propriile cuvinte... prin cuvintele contemporanilor...

Încercând să creionez un portret al Prof. Nicolae Simionescu, m-am uitat, fireşte, în ultimul său Curriculum Vitae şi mi-am dat seama cât de puţin spune acesta despre profilul moral şi intelectual al unui om atât de complex. Dar ce stă scris, de fapt, în acest Curriculum Vitae? O prodigioasă carieră ştiinţifică, cu peste 600 de lucrări publicate (despre care el însuşi spunea, cu modestie, „numeric valoric nesemnificativ"), zeci de cărţi, tratate, monografii, descoperiri, premii şi distincţii – numeroase citări în literatura de specialitate.

Dar ce nu scrie în acest C.V.? Nu scrie cine era de fapt Omul – Nicolae Simionescu, cel ce era făptuitorul a tot ceea ce era scris. Îmi este greu să cuprind în vorbe ce a însemnat Prof. Nicolae Simionescu. Dar m-am gândit să îl prezint chiar prin vorbele lui, deşi nici asta nu este uşor, căci despre el nu vorbea aproape deloc, nu a apărut niciodată la televizor sau în ziare. La insistenţele domnilor Ion Longin Popescu şi Nicolae Ţone, a dat două interviuri, pentru a-l evoca pe Prof. Palade. Ne împărtăşea însă o parte din gândurile lui la Sesiunile Anuale ale Institutului nostru şi ale Societăţii Naţionale de Biologie Celulară, în timpurile grele dinainte de 1989 şi după.

Din ceea ce am spicuit din cuvintele sale aşternute pe hârtie în diverse ocazii, din luările de cuvânt, precum şi din unele date personale la care m-am oprit şi pe care vi le voi mărturisi, am să încerc să creionez profilul moral al profesorului nostru, astfel:

I. Nicolae Simionescu – Omul.
II. Ctitorul Institutului de Biologie şi Patologogie Celulară.
III. Creator al şcolii naţionale de biologie celulară.
IV. Cercetătorul şi profesorul.
V. Membru şi Vicepreşedinte al Academiei Române.
VI. Nicolae Simionescu: romanticul... gânditor...

I. NICOLAE SIMIONESCU: OMUL

Între 1937-1944, Nicolae Simionescu este elev la Liceul „Dimitrie Cantemir"; bacalaureatul îl ia la Liceul „Sf. Andrei". Este un elev sârguincios, anual premiant.

În 1945, intră la Facultatea de Medicină. Din ceea ce mi-a povestit în anul I, dă examenul de anatomie cu marele anatomist Prof. Gr. T. Popa. La sfârșitul examenului, Prof. Gr. T. Popa i-a spus: „dumneata rămâi". I-a fost teamă că asta însemna „dumneata pierzi examenul". Din contră, a însemnat, „dumneata rămâi la catedră". Este student, dar în acelaşi timp preparator benevol, apoi preparator la catedra de anatomie, catedră pe care nu o mai părăseşte timp de 20 de ani. Când termină facultatea cu diplomă de merit, devine asistent, şef de lucrări şi apoi conferenţiar onorific – tot la anatomie. Tot la terminarea facultăţii, marele chirurg Prof. Ion Juvara îl invită să lucreze la el, în Clinica de Chirurgie. Acceptă și lucrează simultan, la catedra de anatomie şi în chirurgie la prof. Juvara, pe care tânărul doctor îl admira în mod deosebit, profesional şi uman. S-au legat printr-o relaţie profundă, s-au admirat reciproc şi au rămas prieteni pe viaţă.

Dar Nicolae Simionescu dorea, mai mult decât orice, să facă cercetare. Spre uimirea tuturor, după 5 ani renunţă la chirurgie şi cere să lucreze în cercetare la Institutul de Endocrinologie. Profesorul Milcu evocă momentul întâlnirii astfel: „Un tânăr, cu o prezenţă de o evidentă maturitate, îmi cere să lucreze în cercetare, renunţând la o situaţie cu posibilităţi mult mai mari, pentru a se lansa în aventura cercetării ştiinţifice, amenintaţă de numeroase incertitudini". Devine cercetător şi anatomo-patolog la Institutul de Endocrinologie, unde începe o colaborare de lungă durată şi deosebit de fructuoasă cu Prof. Milcu. Acesta îl propune anual la specializări în străinătate. Anual este tăiat de pe toate listele. În 1969, o invitaţie total neaşteptată soseşte de la Prof. George Palade din SUA. Cu dificultate, i se dă aprobarea să plece; se alătură echipei Prof. Palade – 4 ani la Universitatea Rockefeller, New York, urmaţi de alţi 6 ani la Universitatea Yale, New Haven. În acest timp visează, speră şi face tot ceea ce este posibil pentru a crea condițiile introducerii cercetării de biologie celulară în ţară.

După 10 ani, în 1979 se reîntoarce în ţară, la Institutul pe care împreună l-am visat, creionat, creat şi al cărui director va fi timp de 16 ani. În această perioadă, lucrează anual 9 luni în România şi 3 luni în SUA, ca „visiting professor" la Universităţile Yale şi Columbia. Munceşte enorm în cercetare, organizare, formare de tineri, îmbogăţeşte Institutul şi cercetarea noastră... În februarie 1995, trecea pentru ultima oară prin faţa Institutului pe care l-a iubit atât de mult, dar…, de data asta, însoţit

de preoţi şi de o mulţime care-l plângea....

Revin la întrebarea: cine este omul din acest complicat Curriculum Vitae? Cine se ascunde în fapt în spatele atâtor pagini „seci" de realizări ştiinţifice, profesionale, sociale şi organizatorice?

În facultate, este fascinat de Prof. Gr. T. Popa; îşi petrece concediile citind şi lucrând, fuge pe munte când poate, se reîntoarce repede și apoi uită să mai plece din laborator. Perioada petrecută la Endocrinologie până la data plecării în "aventura americană" – a însemnat 300 lucrări publicate, multe în colaborare cu Prof. Milcu şi cu mine. Monografia "Cancerul Tiroidian" publicată în Editura Academiei, este cerută pentru publicare de către editurile Heineman din Londra şi Academic Press din SUA. Simultan este şi conferenţiar la catedra de Anatomie.

Iată cum îl descrie Profesorul Ştefan Milcu: "Tânărul Simionescu s-a impus printr-o impresionantă devoţiune în activitatea de investigare şi, surprinzător, prin capacităţile organizatorice ale unui laborator de specialitate. Am fost impresionat de modul deosebit în care îşi desfăşura activitatea. Ca un adevărat cercetător, "n-avea program". Rămânea în laborator până târziu în noapte. Vedea în microscop ce alţii nu vedeau!"

Prof. Milcu s-a străduit să deschidă poarta cercetătorilor către lumea occidentală. El întocmea anual liste pentru plecări la congrese şi specializări: primul pe listă era Nicolae Simionescu. Sistematic, anumite nume dispăreau de pe acele liste. Printre respinşi figura, de fiecare dată, Nicolae Simionescu. "Dragă", i-a spus cu amărăciune Prof. Milcu, „nu te vrea partidul, te-au scos de pe listă. Cică nu ai origine sănătoasă…

" Mai grav a fost faptul că, an de an, era pe lista celor disponibilizaţi de la Catedra de Anatomie a Facultaţii de Medicină. Era considerat un "element nedemn" pentru educaţia tinerilor. Nu avea origine sănătoasă. Din fericire, în fiecare an salvarea venea de la vestitul chirurg, Prof. Theodor Burghele, care era ministru şi care anual punea rezoluţia de neacceptare a concedierii sau "transferului", motivând "calităţile profesionale excepţionale ale conferenţiarului Simionescu".

În afară de profesiune, Nicolae Simionescu are un spaţiu interior generos, plin de vise şi de afecţiune pe care simte nevoia să o dăruiască. Şi-a iubit enorm mama şi şi-a adorat tatăl, pentru care a avut un cult deosebit. Tatăl l-a dus pentru prima oară pe munte (la 5-6 ani) şi a rămas toată viaţa cu o mare iubire pentru ascensiuni. A fost alpinist, schior, iar visul lui era să ajungă în Himalaia. Are în bibliotecă tot ce s-a scris despre expediţiile în Himalaia, care îl fascinau… un vis neîmplinit.

Marea lui preocupare și mândrie sunt băieţii săi, Vlad şi Dan. Le

prevedea un viitor mare, era foarte exigent cu ei, dar o exigenţă plină de dragoste, tandră. Le lăsa toată libertatea de a se desfăşura independent, dar îi veghea cu grijă din umbră. Crede profund în Vlad şi Dan, nu încearcă să-i influenţeze decât prin exemplul personal. Îi tratează totdeauna ca pe nişte "băieţi mari" care trebuie să-şi ia singuri deciziile majore de viaţă. Şi nu a greşit cu nimic...

Îşi adora mica lui nepoată, Adriana, *libelula,* așa cum îi spunea. Iubea prietenii şi prietenia; îi alegea cu mare grijă, dar odată aleşi, le rămânea credincios toată viaţa. Îşi adula maeştrii. Iată ce spunea despre ei: „Am avut deosebitul privilegiu de a lucra cu unii din cei mai remarcabili profesionişti şi oameni de ştiinţă, care mi-au influenţat în mod hotărâtor întreaga mea activitate. Aceştia au fost: Prof. Gr. T. Popa (anatomie), Prof. Ion Juvara (chirurgie), Prof. Şt. M. Milcu (endocrinologie), cu care am lucrat împreună 18 ani, şi Prof. George Palade (biologie celulară), lucrând împreună 10 ani la Universitatea Rockefeller şi la Universitatea Yale, SUA, urmaţi de 13 ani de colaborare, încă în curs. Rolul lor în formarea mea este inestimabil".

Are pentru copii, în general, o tandreţe specială – între cele peste 15.000 de diapozitive din colecţia lui, o bună parte sunt figuri de copii din toată lumea. Iubeşte florile – florile de munte în general şi pe cele din Piatra Craiului în special. Cu aparenţa lui puţin austeră – era un model de graţie şi poezie interioară. Cultura şi memoria sa prodigioasă îi uluiau pe mulţi: după 30-40 de ani de la terminarea şcolii, recita versuri întregi în latină. Cunoaşte toţi fotbaliştii români, italieni sau francezi. Are o trăsătură romantică – ascunsă cu grijă - şi un entuziasm fără limite, dar... nu ştie să se cruţe!

....Deci, cine este Nicolae Simionescu?

II. NICOLAE SIMIONESCU: CTITORUL.

Geneza Institutului de Biologie şi Patologie Celulară povestită de Nicolae Simionescu

Ideea unui Institut de biologie celulară în România a germinat în mintea Prof. Nicolae Simionescu imediat după sosirea lui in SUA. La doar 13 zile după ce a ajuns la Universitatea Rokefeller, Nicolae Simionescu notează în jurnalul său:

"Vineri, 13 Februarie 1970. Cât de mult mi-au lipsit, mai ales la timpul respectiv, o atmosferă adevărată de viaţă ştiinţifică, de cercetare. Ce simplă e, ce firească şi de un singur fel; nu poate fi altfel,

decât într-un sistem fals, artificial. O, dacă aş putea crea un astfel de crâmpei de viaţă adevărat, măcar pentru generaţia următoare de cercetători...”

Iată cum descrie Prof. Nicolae Simionescu (NS) crearea Institutului, în interviul realizat de Nicolae Ţone (NŢ).

NŢ: Cum s-a născut ideea unui Institut de Biologie şi Patologie Celulară la Bucureşti?

NS: „Naşterea acestuia a avut la bază un proces mai lung, în preajma căruia am putea glosa îndeajuns. Vedeţi dv., că vrei să te întorci sau nu vrei să te întorci în ţara ta de origine, că vrei să faci ceva acolo sau nu vrei, eu am considerat şi consider că este ceva foarte personal.

Nu găsesc că am făcut ceva nemaipomenit prin faptul că ne-am întors în România. N-am făcut niciodată caz toţi anii trecuţi în privinţa aceasta, deşi, cum puteţi bănui, facilităţile şi propunerile de posturi de Chairman şi Profesor pe care le-am avut în America le depăşeau de nu ştiu câte ori pe cele ce urma să le primim în România. Dar, încă de la bun început, ideea noastră de bază a fost pur şi simplu să ne formăm acolo şi, cu ce învăţăm , să ne întoarcem în ţară şi să facem un centru de cercetare.

Sentimentul acesta al instituţiei a fost foarte puternic la noi şi e foarte puternic şi acuma. Credem, şi eu şi Maya, în puterea instituţiilor.

Trebuie să faci o casă, trebuie să ai o grădină în care să pui un pom. Trebuie să ai o casă pe care să o înzestrezi cu tot ce este necesar pentru a putea, în felul acesta, să creşti nişte oameni în jurul tău. Nişte oameni deosebiţi. Să faci ceea ce se spune, în termeni mai pedanţi, o şcoală. O şcoală pe care să o ridici la rangul de instituţie. Și cum în anii în care noi am început activitatea în America, virtual biologia celulară nu exista în România, gândul de a fi întemeietorii acesteia aici l-am avut în permanenţă. Prof. Palade ne-a spus: “Mai staţi un an de zile. Unde să vă întoarceţi acolo?” El era foarte realist: “N-aveţi unde să lucraţi.

Nu vă mai puteţi întoarce”. Avea dreptate, pentru că la Bucureşti şedeam propriu zis într-un laborator în care exista un singur microscop cu lumină. Deşi lucram şi dormeam în laborator săptămâni după săptămâni, totuşi absenţa aparaturii era esenţială.

De fapt, Palade ne-a şi explicat, la un moment dat, de ce ne-a invitat pe noi, la prima sa vizită în ţară, dintre toţi cei cu care a interacţionat: “Mi-aţi făcut impresia că sunteţi nişte sisifi amândoi şi mi s-a părut că-i păcat de voi să nu vi se creeze nişte condiţii de lucru rezonabile. Pentru mine, probabil era la mijloc şi un anumit sentiment care ţinea de biografia personală, legat în special de frustraţiile pe care le-am îndurat în tinereţe.

Pentru că am fost un chinuit în tinereţile mele, din punct de vedere a ceea ce am vrut să fac şi a modului dureros în care am fost marginalizat în permanenţă. Nu vreau să mă lamentez, nu vreau să discut despre greutăţile, inechităţile crase de atunci, dar nu pot să uit că mi s-au mâncat foarte preţioşi ani din viaţă.

Astfel că, la un moment dat, în 1972, într-o suită de împrejurări foarte amuzante, m-am aşezat împreună cu Maya în faţa unei hârtii de împachetat şi am spus şi unul şi altul în acelaşi timp: "Hai să facem un centru modern de biologie celulară, să adunăm nişte tineri în jurul nostru, să-i formăm, ca un fel de familie, şi să asigurăm, astfel, o oază de muncă, de linişte şi de seriozitate."

Mai departe, Prof. Nicolae Simionescu spune:

„Am făcut, Maya şi cu mine - şi acele schiţe iniţiale ne-au fost de mare folos - un plan detailat şi am selectat din tot ce văzusem la Rockefeller, în occident, cele mai viabile soluţii. Aşadar, pe scurt, din '73 până în '79 am revenit în ţară în fiecare an şi practic am petrecut vacanţele noastre lucrând cu constructorii, cu arhitecţii, cu instalatorii. În '77 a fost şi cutremurul deosebit de violent, care a întârziat şi el lucările. Câteodată am stat în ţară o lună, altă dată 2 luni de zile. Prof. Palade a fost foarte înţelegător, deşi ne spunea că suntem patrioţi superstiţioşi, iar unii americani nu înţelegeau de ce ne trebuiau nouă asemenea complicaţii. Mulţi însă ne admirau pentru ceea ce încercam să facem.

După o perioadă intensă din toate punctele de vedere, la 3 septembrie 1979 Institutul a fost deschis oficial printr-un Simpozion inaugural de prestigiu." Printre invitaţi se numărau profesorii George Emil Palade, Christian de Duve şi Gunter Blobel, toţi laureaţi ai Premiului Nobel.

Clipele de sărbătoare adevărată n-au ţinut însă prea mult, pentru că ministerul ne-a adus la cunoştinţă că nu mai poate să ne asigure niciun fel de fonduri. Înţelegeţi, după ce am făcut tot ceea ce am făcut pentru înfiinţarea institutului, ni s-a spus: "Regretăm, dar din momentul acesta sunteţi fără niciun ban". Atunci, soluţia a fost una singură: să apelăm la subvenţii din afară. Am intrat, astfel, în sistemul de competiţie al Institutului Naţional de Sănătate din S.U.A (NIH), singura Instituţie care la acel timp oferea grant-uri în afara ţării. Şi, spre şansa noastră, înregistrând scoruri suficient de bune, am primit timp de 12 ani subvenţiile solicitate în SUA. Am fost singurul institut din Estul Europei care a obţinut asfel de grant-uri din SUA şi unul din cele 7 granturi acordate în afara Statelor Unite (în afară de Argentina, Israel, Elveţia etc).

Pe lângă fondurile pe care le-am primit prin grant-urile amintite, obținute de la NIH, fonduri care s-au ridicat în total la peste 400.000

dolari, din 1979 şi până în anul acesta, noi ne-am făcut un obicei - nu foarte confortabil, nu foarte simplu - din a aduna materiale pentru Institut. În acest mod, colectam de la prietenii noştri, de la colegi, de la cunoscuţi, chimicale, cărţi, reviste, chiar unele piese de echipament şi aparate costisitoare. Le împachetam, le încărcam într-un camion la Universitatea Yale (la 120 Km de New York) şi le duceam la aeroport. În medie, am transportat o tonă de materiale şi echipament în fiecare an. Cu totul am adus în Institut până acum 14 tone. În acei ani, o doamnă ("tovarăşă") ministru al învăţământului, ne-a trimis în Institut o comisie de anchetă, aflând că ne-a venit de la aeroport un transport din coletele pregătite de noi în S.U.A, pentru ca să afle ce şi de ce transportam materiale pentru Institut din SUA? Greu să priceapă de ce o facem!

La ideea Prof. Palade, s-a stabilit o convenţie formală între Ministerul Invăţământului din România şi cel din SUA (în 1979), de a rămâne "visiting professors" la Yale. Ideea Prof. G. Palade a mers binişor 4-5 ani. Apoi, a fost din ce în ce mai greu să plecăm din ţară, iar în 1989 am obţinut aprobarea cu foarte mari dificultăţi."

Prof. Palade, întrebat la un moment dat dacă a fost urmărit de Securitate, a spus: "Am fost, probabil, urmărit de câte ori am venit să-mi văd surorile, să-i întâlnesc pe profesorii Nicolae şi Maya Simionescu, să particip la diferite simpozioane. Câtă vreme regimul nu-şi putea exercita în întregime influenţa asupra Institutului de Biologie şi Patologie Celulară (Institut care beneficia şi de o importantă finanţare americană), era firesc să fiu urmărit, deoarece veneam la întâlniri de lucru cu cercetătorii români. Ori, IBPC era, în mintea dictatorilor, o agentură de spionaj a CIA" (Curierul Românesc, iunie, 1992).

La Prima Sesiune Ştiinţifică a IBPC, în 1980, Prof. Nicolae Simionescu spunea: „În viitorul apropiat, ştim înspre ce ne îndreptăm, dar nu ştim ce vom găsi… Am elaborat planuri, dar nu şi predicţii, pentru că, în realitate, dacă lucrurile ce vor fi găsite vor fi într-adevăr noi, ele sunt prin definiţie necunoscute azi. Suntem tonifiaţi de fiecare observaţie nouă şi, în acelaşi timp fericiţi că suntem atât de ignoranţi, încât să facem din fiecare zi, când reintrăm în laborator, o confruntare cu propriul nostru intelect".

În descrierile sobre ale lui Nicolae Simionescu despre realizarea IBPC nu se dezvăluie greutăţile enorme pe care le-am întâmpinat, lupta cu autorităţile, îndeosebi după 1979, eforturile şi reuşita în trimiterea a 14 tineri cercetători români în SUA, pe burse Fullbright pentru un an şi apoi, anual sau pe termene mai scurte sau mai lungi, alţi 15 – 18 cercetători, tot în SUA. Pentru fiecare trebuiau cam doi ani de lupte cu forţe oculte, circa 20 de semnături şi tuturor li se găseau probleme (ori este prea tânăr, or neînsurat, or are rude în străinătate).

În 1984, Prof. Simionescu îl destituie (fără preaviz), în 24 de ore, pe şeful de Cadre al Institutului (Domnul M) pentru că făcea mizerii tinerilor noştri colaboratori; începând cu a doua zi, nu i-a mai dat voie să intre în Institut. Faptul nu a rămas fără urmări pentru noi. Şeful de cadre nu a mai intrat în Institut, dar l-a dat în judecată pentru că, după cum scrie: "măsura o consider abuzivă, amintindu-mi de patronii capitalişti cu care nu putem avea ţeluri comune, aflându-ne într-o permanentă contradicţie antagonistă… aţi încălcat legislaţia muncii socialiste… servesc cu devotament şi profundă claritate cauza revoluţiei noastre socialiste."Semnează, tovarășul M. Dar noi am câștigat procesul.

Presiunile exercitate asupra noastră au fost din ce în ce mai consistente, mai dese. Organizat cu suport financiar de la NIH, la fiecare trei ani a avut loc un simpozion româno-american. După cel din 1989, am fost chemaţi imediat la minister şi traşi la răspundere: "Trebuie să vă apăraţi, ni s-a spus, că aveţi trei capete de acuzare.

Primul că sunteţi spioni, pentru că aţi vândut secrete ştiinţifice româneşti americanilor. Al doilea, tot ce aţi lucrat, toate temele pe care le-aţi avut n-au fost niciodată aprobate de statul român şi, în al treilea rând, că nu publicaţi decât în reviste străine." Ni s-au cerut o serie de documente în apărarea noastră. În fine, o perioadă tristă! Am avut mare noroc cu schimbarea din 1989… Important rămâne faptul că Institutul există şi şi-a căpătat un binemeritat prestigiu, şi în acest prestigiu se află bucuros implicată chiar viaţa noastră şi a întregii echipe de cercetători de aici.

III. NICOLAE SIMIONESCU: FONDATORUL SOCIETĂŢII NAȚIONALE DE BIOLOGIE CELULARĂ

Profesorului nu i-a fost îndeajuns crearea Institutului - deschis tuturor cercetătorilor din ţară. El dorea o şcoală naţională de biologie celulară. De aceea, în 1981 începe să gândească o Societate Naţională de Biologie Celulară. O perioadă grea – nu se mai făceau Societăţi. El reuşeşte. În viziunea lui, aceasta "trebuia să fie o societate interdisciplinară şi multidisciplinară – să fie prima de această complexitate şi unitate". Reuşeşte!

În iulie 1982, are loc Şedinţa de înfiinţare a Societăţii Naţionale de Biologie Celulară (SNBC), la Bucureşti. Cu acest prilej, Profesorul ne spunea: Nu e nevoie de "încă o Societate" ci de una care să vrea şi să poată efectiv reprezenta un mijloc eficace de a ajuta dezvoltarea la parametrii deceniilor moderne ale cercetării biomedicale, a

învăţământului biologic şi medical. SNBC să fie o Societate a unor oameni curajoşi, demni şi neabătuţi în dorinţa de a face ceva bun pentru ţara noastră. De ce facem o nouă societate?

(1) Ca să ne aducem aminte de minunaţii cărturari şi oameni de ştiinţă ai ţării noastre care, în vremuri grele, au ştiut să găsească resursele spirituale şi fizice pentru a crea asociaţii şi societăţi ştiinţifice şi culturale ce au modulat hotărâtor istoria social-politică şi culturală a ţării; şi

(2) Să înţelegem obligaţia ce ne revine de a lăsa generaţiilor viitoare un început de drum". Societatea şi-a creat imediat 7 filiale în marile centre universitare din ţară. Astăzi, are 13 filiale. Sesiunile anuale au devenit în timp mai fructuoase pe plan ştiinţific, şi au stabilit trainice legături profesionale şi umane. Profesorul folosea fiecare sesiune anuală a SNBC pentru a ne împărtăşi gândurile sale profunde şi curajoase, pentru a ne da speranţă (în vremurile acelea nemiloase), a ne menţine entuziasmul. Iată doar câteva exemple din cuvintele lui: Atenţie! Suntem înainte de 1989!

În 1985, la Sesiunea SNBC de la Tg Mureş:

„Acum mai puţin de 200 de ani (1794), Lavoisier a fost condamnat la moarte prin ghilotină de un judecător care i-a scris în actul de condamnare: "La Republique n'a pas besoin de savants". Existenţa şi activitatea SNBC arată nu numai că ţara noastră are nevoie, dar că a şi produs oameni de ştiinţă capabili să contribuie în continuare la patrimoniul inestimabil al cunoaşterii.

Asta nu înseamnă că nu mai există şi astăzi judecători deghizaţi care, neînţelegând nimic din măreţia revoluţiei ştiinţifice, continuă să condamne ceea ce nu înţeleg. În condiţii care nu sunt deloc uşoare, Societatea noastră trebuie în continuare să pună la baza dezvoltării ei ŞTIINŢA, SUFLETUL, PATRIOTISMUL. Astfel, vom putea privi cu optimism spre anii ce vin, în care noile generaţii să facă să nu mai apară niciodată un alt judecător al lui Lavoisier".

În 1986, la Sesiunea SNBC din Craiova:

„Să folosim şi această sesiune pentru o mai bună cunoaştere reciprocă, mai adânc respect al muncii fiecăruia (în special a celor care o fac în condiţii mai grele) şi, ca un corolar, să închegăm şi mai mult comunitatea noastră profesională, formată din oameni cărora le pasă, care n-au fost atinşi de ceea ce unii numesc "forma inferioară a libertăţii, NEPĂSAREA".

Sesiunea SNBC, Iaşi, 1987:

„Aflaţi aici în Iaşi, minunat lăcaş de cultură, în intimitatea minţii şi sufletului nostru, să închinăm această sesiune nesecatei inteligenţe româneşti… cea care a creat valorile care de-a lungul anilor, buni sau mai puţin buni, au asigurat regenerarea spirituală care a stat şi stă la baza permanenţei acestui popor. Să privim cu optimism viitorul şi posibilitatea de a contribui semnificativ la progresul ştiinţific".

Sesiunea SNBC, Constanţa, iunie 1989:

„În epoca în care trăim, activitatea SNBC este o briză de cultură, un act de patriotism, dar patriotism înseamnă, în cazul nostru, ştiinţă mai multă şi mai bună. Nu sunt vremuri simple, dar să avem un optimism activ. Şi să fim animaţi de sentimentul că prin această societate, împreună am făcut să încolţească o mică floare, asemenea Micului Prinţ care îşi uda zilnic floricica pe care o sădise pe mica lui Planetă. Şi noi să îngrijim floarea noastră, în năzuinţa că va deveni perenă şi nu numai să o îngrijim, ci şi s-o protejăm pentru că, aşa cum spunea anticul dumneavoastră concetăţean, Ovidiu: "*felix qui, quod amat, defendere fortiter audet*" (Fericit cel ce cutează să apere cu putere ceea ce iubeşte). Vă doresc cutezanţă, putere şi mult succes".

După 1989, Societatea este la fel de tonică şi activă, iar Profesorul îşi continuă pledoariile pentru apărarea cercetării, a ştiinţei. Astfel, revenind la Tg. Mureş în 1994, în cadrul sesiunii anuale, ne spune: „Acum 9 ani, în 1985, la cea de-a III-a Sesiune Anuală a Societăţii Naţionale de Biologie Celulară, ne-am adunat în acelaşi auditorium. Eram în plină perioadă de brutal anti-intelectualism pe care am avut curajul - şi nu fără urmări - de a-l demasca, evocând soarta lui LAVOISIER care - exact acum 200 de ani (1794) - era condamnat la moarte prin ghilotină, fiindu-i scris în actul de condamnare:

"La Republique n'a pas besoin de savants!" În aceşti ultimi 9 ani, ţara noastră a trecut prin zbuciume şi jertfe dintre care unele au dus şi la transformări în mai bine: - ca oameni de ştiinţă suntem liberi să ne ducem unde vrem, să spunem ce vrem, să colaborăm cu cine vrem. Şi totuşi, aceste evidente câştiguri nu ne sunt de-ajuns. Şi, fără a însemna că ne lamentăm, trebuie să spunem pe nume condiţiilor de viaţă foarte grele şi facilităţilor de lucru nesatisfăcătoare.

Desigur, nu mai trăim în vremuri ca acelea ale lui Lavoisier, dar, din păcate, ştiinţa în România nu a ajuns la statutul pe care-l merită, deoarece sunt unii care, din incompetenţă, ignoră ştiinţa şi pe cei care o

slujesc. Mai mult, alţii contestă rolul cercetării şi îndeosebi a celei fundamentale în progresul socio-economic, în felul acesta condamnând ceea ce nu înţeleg. De aceea, în aceste vremuri comunitatea ştiinţifică trebuie să iasă din pasivitate şi să-şi impună punctele de vedere, pentru a schimba mentalitatea organelor de decizie. Democraţia nu înseamnă populism şi politicianism declarativ. Democraţia implică competenţă, responsabilitate şi intelocraţie".

IV. NICOLAE SIMIONESCU: CERCETĂTORUL - PROFESORUL

Cercetătorul. Nicolae Simionescu privea cu cucernicie cercetarea ştiinţifică. O socotea, după cum scria în 1984 „Efortul intelectual cel mai creator de care omul este capabil. În istoria omenirii, nevoia de cunoaştere a apărut ca o trăsătură definitorie a fiinţei umane. În lupta cu natura, omul a trebuit să caute sau să creeze mijloace de adaptare, apărare sau atac. Astfel, cunoașterea din curiozitate a fost ulterior arbitrar definită "cercetare fundamentală", iar cunoașterea generată de nevoia de soluţii a fost, într-un sens foarte larg, numită cercetare aplicativă. Această taxonomie este larg criticabilă, iar folosirea acestor termeni operaţionali în politica ştiinţei a creat şi creează încă dificultăţi şi uneori erori în soluţii."

„...Cercetarea fundamentală în biomedicină are prin obiectul ei - omul - cea mai aplicativă dintre cercetări, deoarece se adresează omului ca fiind nu numai pateticul nostru capital, dar neîndoielnic unicul producător al oricărei alte cercetări."

Iată cum îl priveşte prof. Milcu pe cercetătorul Nicolae Simionescu: „În acest tânăr, care a apărut în faţa mea, am simţit imediat patosul, acea forţă interioară căreia nu-i rezistă nimic. Ce tensiune interioară, ce aspiraţie spre cunoaştere, că în fond ştiinţa la asta ne aduce: la cunoaştere şi la o reflectare mai reală a tot ceea ce vedem căutând, dacă ai insomnie, explicaţia a tot ce ai văzut în ziua aceea. Şi el într-adevăr a demonstrat-o din plin. Nicolae Simionescu ştia că atunci când începe o cercetare, dacă trebuie să stea noaptea, rămâne noaptea până termină, şi i-am spus: "Vezi că acolo au trecut mulţi şi nu au văzut, poate vezi tu." Şi, într-adevăr, în cancerul glandei tiroide, în care trecuseră alţii, el a reuşit să vadă cancerul medular. Acei ochi pătrunzători şi mintea care se ascundea îndărătul lor au pătruns în ceea ce alţii nu au văzut. A fost un descoperitor."

Duşmanul său cel mai aprig era timpul. În 1970, la Universitatea Rockefeller, scria în jurnalul său: „Îmi place atât de mult ce fac şi cât învăţ,

încât simt o cronică lipsă de timp. Mă simt ca Pigafetta, (cronicarul şi biograful lui Magellan): caut drumul prin endoteliu (continentul american cu porţiunile lui turtite) spre spaţiul extracapilar (Oceanul Pacific)..."

Ideile şi descoperirile Prof. Nicolae Simionescu sunt ample, originale şi au fost preluate rapid de comunitatea ştiinţifică internaţională. Colaborarea excelentă cu Prof. S. Milcu a îmbogăţit substanţial literatura de specialitate în studiul tiroidei şi suprarenalei. Cartea lui despre tiroidă i-a adus recunoaştere internaţională şi premiul Academiei Române. Noile date aduse în colaborare cu Prof. George E. Palade şi cu mine, în studiul transportului macromoleculelor prin endoteliu, au avut darul ca, în 10 ani, disputa dintre biologii celulari şi fiziologi să se apropie de un punct de vedere comun. Descoperirile şi ipotezele noastre asupra rolului veziculelor în transport au fost validate, în decursul timpului, prin tehnici moderne de biologie moleculară; azi, sunt total acceptate în literatura ştiinţifică. Termenul şi conceptul de "transcitoză" şi mecanismele sale au devenit atât de clasice, încât nici nu mai este citat autorul, Nicolae Simionescu. Nu cred că l-ar supăra.

Profesorul. Prin anii 1960 am fost de mai multe ori la cursurile de anatomie ale Profesorului. Erau fenomenale. Studenţii îl primeau cu aplauze, iar la sfârşitul cursului pleca tot în aplauzele studenţilor; el se simțea evident stânjenit. Interesant, după 20 de ani, la Universitatea Yale, alte cursuri, alţi studenţi, aceleaşi aplauze. Studenţii l-au propus ca "Teacher of the Year" pentru Premiul Borum. Îi plăcea să predea, să explice, să comunice, să transmită. Avea vocaţie pentru catedră, după cum avea vocaţie pentru laborator: era răbdător, jovial şi exigent. Una din maximele sale era: "Accept pedeapsa exigenţei. Detest iertarea indolenţei".

David Castle, un fost student american al Profesorului spunea:

„Nicolae Simionescu a fost un maestru al predării prin metoda socratică şi a fost întotdeauna principalul meu model de urmat. Mă simţeam fericit când ştiam că este mândru de mine".

V. NICOLAE SIMIONESCU: MEMBRU AL ACADEMIEI ROMÂNE (1990) VICEPREŞEDINTE (1994-1995)

Prof. George E. Palade a sesizat cel mai bine rolul pe care Nicolae Simionescu şi-l asuma în Academia Română. El spune:

„Nicolae Simionescu a acceptat aceste noi responsabilităţi cu sentimentul misiunii de a îmbunătăţi condiţiile şi nivelul de finanţare al cercetării în România. Ceea ce el a simţit că este valid şi are succes în ţările vestice, a încercat să le adapteze la nevoile comunităţii ştiinţifice din ţară".

În 1994, ales Vicepreşedinte al Academiei Române, lansează un „Plan de acţiuni pentru îmbunătăţirea cercetării ştiinţifice în Academia Română" – un plan larg, sistemic şi temerar pentru reforma activităţii de cercetare în Institutele Academiei. În cadrul multiplelor acţiuni avute în vedere, a iniţiat în Academia Română primul sistem de Grant-uri competitive de cercetare din România. A fost primul pas făcut pentru un viitor mai bun al cercetării românești.

În mai 1994, Nicolae Simionescu inaugurează în revista "Academica" rubrica inspirat intitulată "Quo Vadis Academia?" El scrie:

„(1) Este notoriu că știința contemporană avansează într-un ritm extrem de alert, la care toate comunităţile ştiinţifice fac un deosebit efort de a se racorda. Chiar dacă cercetarea ştiinţifică (CS) în Academia Română (AR) ar merge excelent, totuşi prin natura şi scopurile ei în permanentă adaptare, activitatea de cercetare se cere în continuare ameliorată. Din păcate însă, datorită unui complex de motive, cercetarea în Academia Română nu atinge decât în puţine domenii performanţele la care o îndreptăţeşte potenţialul intelectual al acestei instituții. Îmbunătăţirea CS reclamă unele reconsiderări în mentalitate, management, structură instituţională, mecanisme de finanţare etc.

(2) Dacă nu facem un efort să modernizăm şi să revitalizăm CS în Academia Română, fără voia noastră vom fi părtaşi la pericolul grav al perpetuării şi adâncirii decalajelor tehnologice şi de competitivitate ale României şi, prin asta, la pierderea identităţii patrimoniului intelectual românesc în cadrul comunităţii ştiinţifice internaţionale.

(3) Modernizarea condiţiilor de lucru şi asigurarea nivelului de trai corespunzător misiunii sociale a omului de ştiinţă este cel mai bun remediu al "brain-drain"-ului, pentru prevenirea căruia, din păcate, nu se întreprinde nimic. De aceea, este esenţială luarea urgentă de decizii politice care să ateste concret că chiar şi într-o perioadă de declin economic, sprijinirea cercetării fundamentale este o datorie morală a Statului. Investiţia constantă în ştiinţele de bază şi în formarea noii generaţii de oameni de știință este cea mai lucidă şi mai sigură investiţie în viitor.

Pe firul continuităţii valoroaselor noastre tradiţii, avem datoria morală să încercăm să asigurăm apariţia spiralelor ascendente ilustrate de Salieri, dar şi de cât mai mulţi Mozart.

În cadrul acestor măsuri, Academia Română va institui, începând cu anul 1995, o finanţare competitivă a cercetării ştiinţifice prin Grant-urile Academiei Române (GAR). Sistemul GAR introduce principiile stimulative ale liberei competiţii în ştiinţă, care a constituit şi reprezintă şi în prezent una dintre cheile remarcabilelor progrese ştiinţifice şi tehnologice obţinute în ţările avansate; el va funcţiona concomitent cu finanţarea pe programe şi proiecte în cadrul instituţional actual al Academiei Române."

Considera Academia locul unde trebuie să coexiste: *maxima scientia et maxima moralia* (Maya Simionescu şi Nicolae Simionescu, Academica 2001). Din păcate, timpul nu i-a dat răgazul să facă tot ceea ce şi-ar fi dorit pentru cercetarea din Academia Română şi din România.

Ideile profesorului despre Academie au fost sintetizate de el în următoarele puncte:

1. Academia este o parte şi o emanaţie a cercetării ştiinţifice.

2. Academia are nevoie de un sistem de criterii obiective pentru evaluarea unei candidaturi.

3. Academia are nevoie să primească tineri scientişti.

4. Generaţia „calendaristică" vs. generaţia „ştiinţifică". Aici, se impune o precizare. Spiritul nou şi concepţia modernă asupra cercetării şi organizării ei nu sunt un atribut exclusiv al generaţiilor mai tinere. Prin pregătire, experienţă, condiţii de lucru, calităţi personale, potenţial biologic şi performanţa profesională, fiecare dintre noi poate fi definit şi prin doi parametri care reflectă apartenenţa la o anumită generaţie: "biologică" sau "ştiinţifică".

Academia este o emanaţie şi o parte a cercetării ştiinţifice. Generaţia „biologică" (calendaristică) se dovedeşte, în unele cazuri, a fi neesenţială, cum este exemplul unor eminenţi oameni de ştiinţă, ca Prof. Ştefan Milcu sau Prof. G. E. Palade (exemplele sunt numeroase). Beneficiari ai unei structuri biologice şi intelectuale de excepţie, prin felul în care gândesc şi acţionează, ei au aparţinut şi aparţin în continuare generaţiei ştiinţifice tinere, de avangardă. Cât de relativ este impactul generaţiei biologice asupra performanţelor profesionale se poate vedea şi în strălucitele exemple din alte domenii, ca cele ale artei şi culturii (P. Picasso, P. Cassals, A. Rubinstein, A. Horowitz etc.)."

VI. NICOLAE SIMIONESCU: ROMANTICUL GÂNDITOR

Poate aceasta este partea cea mai ferită de lume a profilului uman al lui Nicolae Simionescu. Iată câteva din gândurile sale pasionate şi pasionante despre cercetarea ştiinţifică:

„Cercetarea ştiinţifică este mai mult decât o profesie, este un mod de a trăi, cu strădanii reuşite alături de încercări nereuşite, iar între ele marea agitată a îndoielilor care te invită la înţelepciune. Iar în lupta dintre bucuria succeselor şi amăreala eşecurilor, principalul instrument de conservare rămâne pasiunea." „Nu se poate construi nimic durabil, dacă în materialul de construcţie nu este adăugat *quatum satis* - suflet. Fără dăruire nu poţi deveni niciodată ceea ce admiri".

„Cercetările de Biologie Celulară şi Moleculară din ţara noastră trebuie să se adreseze din ce în ce mai mult marilor probleme ale materiei vii… Ştiinţa mare este generată de întrebări mari şi de setea de răspunsuri la marile întrebări ale cunoaşterii, răspunsuri care odată obţinute, vor genera noi întrebări şi mai profunde…

Năzuinţa biologilor celulari spre adevărul ştiinţific este o izbândă a adevărului în general, de care societatea noastră are atâta nevoie… Orice minte lucidă poate înţelege că România intră mai repede în Europa şi în Lumea civilizată, în primul rând prin cultură şi ştiinţă şi mai puţin prin autoturisme Dacia sau Lăstun…

De pe o astfel de poziţie, finanţarea corespunzătoare a Cercetării Fundamentale nu apare ca un lux, ci ca cea mai potenţial productivă investiţie în inteligenţa românească. Cu atât mai mult cu cât avem în ţară laboratoare de Biologie Celulară care sunt de mult şi bine intrate în Europa şi în Lume…

Nesusţinându-le, riscăm să distrugem şi puţinele capete de pod construite atât de greu… Orice minte informată ştie că nu se poate sconta pe un progres economic fără sprijinirea cercetării fundamentale…"

„Desigur, ignorarea cercetării are ca efect negativ şi HEMORAGIA alarmantă la care asistăm: internă, spre alte profesii mai productive, şi externă, care duce la un vid de valori şi absorbţia de demagogi şi nonvalori. Speranţa rămâne în cercetătorii tineri - infuzie de "fresh blood". În condiţiile lipsurilor actuale, ştiu că e greu să vorbeşti despre PATRIOTISM. Şi totuşi…

Dacă Dăruire nu e, nimic nu e…"

În puţinele ore de răgaz, sculpta în lemn, compunea muzică şi scria

poezii. Profesorul compunea muzică, sculpta şi scria poezii. Multe, frumoase şi ţinute ascuns de ochii lumii. Nu ştiu ce este firesc să fac cu ele, mărturisește doamna Acad. Maya Simionescu...

Acum, aici, am să destăinui o poezie scrisă de el cu mulţi ani în urmă, dar care azi are o încărcătură emoţională specială:

Oglinzi

Eu însumi am crescut în mine.
Şi cel mai acru rău şi cel mai zdravăn bine
Nimeni nu mi le-a dat
în măsura în care le-am adunat.

Şi am să fug singur cu ele-n gol
în ziua în care am să uit să mă scol.

Privind lumea din colţ
întind mâna spre mijloc, iar uneori
privind-o din mijloc implor
pentru încă-un mâine.

De fapt, oglinzi
pretutindeni oglinzi
aproape numai oglinzi.
New York, 29 mai 1970

În seara de duminică, 5 februarie 1995, scria un articol despre "Rolurile Academiei Române". S-a culcat şi... "a uitat să se scoale".

Vlad Simionescu, fiu : O POVESTE... CHINEZEASCĂ

Primul lucru pe care l-am învățat de la tata a fost ce înseamnă excelența. Cum abordezi și rezolvi un lucru în perspectivă, nu pe moment. Ideea lui era că, dacă faci ceva, să faci nu bine, ci ireproșabil. Nu era profesor de lucru manual: dăm cu pila și iese bine...

Nu agrea compromisurile, divagările, dar nici scurtăturile.

Pe lângă faptul că dorea ca totul să fie perfect, era și foarte pudic. Nu l-am auzit înjurând în public sau în fața noastră, a copiilor. Nu spunea nimic cu ”dracul”. Toți îl acceptau ca fiind un om foarte simplu și natural; deciziile veneau de la el, nu filtrate prin alții. Era, de asemenea, un puritan. În cazul lui, nici nu trebuie să vorbim de bani; aveam, n-aveam... Noi, copiii, n-am primit niciodată bani de la părinți, în afară de cei 3 sau 10 lei pe zi. Am fost învățați să nu vrem ceva care nu este legat de ceea ce am fi vrut să facem. ”Jucați-vă”! era cuvântul de ordine. Adică, în traducere, ”imaginați-vă ceva!” Cu toate că ne era apropiat, nu subvenționa niciun fel de aventuri bănești. Pentru el, cel mai important era ca noi, băieții, să ne realizăm profesional, independent de poziția sa. Codul moral rigid nu-i permitea nicio abatere de la această regulă.

Cu el nu discutam niciodată amănunte; discutam numai principii.

După terminarea facultății, mi-am arătat interesul de a face mai mult, ca arhitect, decât blocuri. Tată, am spus, cred că străinătatea mi-ar oferi o șansă în plus... Atunci, mi-a răspuns că și el simțea nevoia să merg mai sus. Mi-a promis că va încerca varianta ”America” și, până la urmă, cu toate piedicile, a reușit. Pentru că avea o mare putere de convingere, putea să convingă pe oricine de principiile sale, de lucrurile dorite. În simplitatea lui era, de fapt, foarte sofisticat. Când spunea ceva simplu, avea în spate zile de gândire și premeditare. Până la urmă, trei ani au durat pregătirile pentru plecarea mea. Ca să plec mai repede, i s-a cerut o antenă parabolică de satelit, dar a refuzat.

Era natural și simplu. În poziția lui de profesionist, nu l-au putut ”agăța” politic. Securitatea n-a putut să-l ”atingă”, deoarece avea o armă redutabilă: toți tinerii trimiși în SUA la specializare se întorceau. Acest

aspect era greu de înțeles pentru ofițerii care-l supravegheau, îi irita și-i provoca mereu, ajungând să vadă în Profesor exact ceea ce era, nimic mai mult. Dar nici mai puțin. Până la urmă, securiștii au sfârșit prin a-l ajuta, în paralel cu activitatea constantă de urmărire. Le-a impus respect, deoarece nu avea nimic de ascuns, făcea numai știință.

N-a mințit niciodată. Nu făcea gesturi exagerate pentru a salva situațiile, cu toate că acestea se complicaseră pe măsură ce dictatura își trăia ultimii ani. Ideea morală a fost pavăza sa imbatabilă. Să faci totul cât mai bine, ca și cum în jur ar fi fost o societate normală. Să ai mereu viitorul în față, deoarece comunismul va dispărea într-o zi. Avea această viziune, această credință pe care o împărtășea celor apropiați.

Nicule, îi spunea Palade, aici, în America e viitorul tău! Nu! răspundea Simionescu. Viitorul meu e în România. De aceea, niciodată, oricât a fost de greu, nu și-a pus problema să plece din țară. Și nici noi, fiii lui.

Îl vedeam o dată pe săptămână. Treceam de plăcere pe la Institut. Era mereu foarte ocupat, dar niciodată nu m-a primit cu alt aer decât cel de acasă. Era un adevărat părinte: se uita la tine și știa ce probleme ai. N-a spus niciodată: fă asta, băiatule, că-ți spun eu că e bine! Se ferea să ne dea sfaturi; totuși, îl simțeam lângă noi, îi simțeam protecția. N-a ridicat niciodată tonul: nu ne-a bătut niciodată. În schimb a ținut să devenim responsabili. Ura bâlbâiala, lipsa de fermitate, ascunderea ”după deget” – caracteristici ale ”Omului Nou” creat de sistemul dictatorial. El era, de fapt, un om normal. Sistemul era anormal. De aceea l-a și învins, prin logica sa implacabilă, prin responsabilitatea manifestată chiar și în cea mai neînsemnată împrejurare.

Era o personalitate. A avut ceva în cap și chiar și-a pus în practică ideile. A făcut. Aceasta-i personalitatea: determinarea și ambiția de a face ”cum vreau eu” pentru țară. Era onest, dar nu modest. Nu putea niciodată să stea degeaba. Tot timpul împărtășea ceva, avea ceva de comentat. A încercat să se afirme nu contra sistemului, ci în paralel cu sistemul. N-a fost niciodată în disidență, ca un scriitor. ”De ce nu puneți steagul roșu lângă microscop?” a fost întrebat de un politruc. ”Nu e treaba mea asta”, a răspuns. ”Voi sunteți cu steagul, eu cu microscopul...” Și totuși, s-a ciocnit cu sistemul, deoarece, la un moment dat i s-a cerut să facă cercetări pentru agricultură, că sunt ”mai folositoare”. N-a abdicat. ”Lucrez românește”, a spus, „dar nu prostește”.

Cum lucra? Era un adevărat spectacol să-l vezi în biroul de acasă. Îl

năpădise administrația, dar a făcut față tocmai pentru că era foarte organizat. Avea zeci de dosărele pe care le întindea pe podea, pe canapele. Se târa în patru labe și făcea adnotări în fiecare.

Avea o bucățică de hârtie la el tot timpul, chiar și la masă. Se întrerupea din mâncat și scria. Scria cu creionul, nu cu pixul. Tăia subțire, ca să înțelegi ce-a fost, în caz că revenea. Întotdeauna lucra pe termen lung, avea bătălii multiple de dus. Le anticipa Maya, fiind mereu alături de el și, având o gândire mai analitică, l-a ajutat mult în sortarea datelor. De aceea, uneori avea timp și de mine. ”Ce faci, băiatu`?” îi plăcea să mă întrebe.

În concluzie: economiștii au înțeles că era o forță și unii responsabili din CC au încercat, discret, să se erijeze în prieteni de familie. Când s-a pus problema demolării IBPC, l-ar fi dorit plecat definitiv în America, să nu fie obligați să-l privească în ochi în momentul în care buldozerul și-ar fi început treaba.

Dar el nici nu s-a gândit să plece, deoarece dorea să lupte până în ultima clipă. La fel ca Amundsen, care a dorit cu orice preț să ajungă la Polul Nord. Deși descoperise căldura în America, Simionescu a vrut să vină aici, unde se afla propriul lui Pol Nord. El nu a fost nici Făt Frumos, nici Zmeul Zmeilor. Ca profesor a fost aspru, dar corect. Povestea lui, totuși, este mai degrabă una chinezească, decât una tipic românească.

Dan Simionescu, fiu: GRAȚIOSUL PRIM VIOLONIST AL ȘTIINȚEI

Nicolae Simionescu a fost plămădit din calități umane și profesionale caracteristice unui lider de orchestră care, în același timp, are datoria de a oferi linia muzicală directoare, dar și de a participa alături de întreg ansamblul la ducerea la bun sfârșit a simfoniei.

Ca profesionist, Nicolae Simionescu demonstra o grație aparte, o dulceață lipsită de dulcegării, atât în conjuncturi mai relaxate, cât și sub presiunea permanentă a competiției inerente. Ca prim violonist într-o orchestră, Profesorul se expunea modest și fără menajamente în fața publicului, forțându-i peste limitele umane, cu o voință ieșită din comun, mintea, talentul și nervii pentru a construi și finaliza opere memorabile.

Setea permanentă de noi provocări, asociată cu capacitățile naturale de a le aborda, au construit premisele unor realizări deosebite. Aventurier fără frică, luând asupra sa rolul de realizator și conducător al Institutului de specialitate, Profesorul a înțeles de la bun început că această funcție este înzestrată cu mai multe îndatoriri și sacrificii personale decât bonificații. Mai mult decât atât, pornind la drum cu un grup de tineri entuziaști, Nicolae Simionescu a decis ca prin exemplul personal să creeze o școală caracterizată prin profesionalism, dedicație și abnegație.

De la bun început a demonstrat o capacitate organizatorică deosebită, calitate dublată de planificarea riguroasă a activității, de exercitarea unui spirit autoritar uman, fără duritați excesive, aplicând dreptatea fără părtinire și solicitând fiecărui colaborator intern sau extern să-și depășească limitele. După finalizarea cu succes a operei profesionale, concomitent cu începerea aplauzelor publicului, grațiosul prim violonist, printr-un gest discret, nu uita să dea semnalul ca întreaga orchestră să se ridice în picioare și să-și primească aprecierile.

Judecând obiectiv, cu considerația cuvenită, fiecare efort personal de progres științific sau organizatoric, Nicolae Simionescu a avut răbdarea să investească timp în cercetarea românească în general, să încurajeze și să propună direcții de dezvoltare în perspectivă. Nefiind interesat de titluri sau distincții deosebite, nu s-a angajat în funcții de decizie

suplimentare decât atunci când a considerat că acele funcții îi vor permite realizarea viselor profesionale de interes general.

Adevărat constructor de spirit, Profesorul în permanență visa și gândea, dar nu se lăsa condus de vise și nici nu-și făcea din gândire un scop al vieții. Cu un talent rar întâlnit, reușea cu dezinvoltură să transmită interlocutorilor săi, fie ei oameni simpli sau personalități științifice sau culturale de talie mondială, visele sale.

Tratând triumful și dezastrul cu aceeași notă de optimism incurabil, Profesorul a reușit să molipsească o mare parte din colaboratori, menținând flacăra științei românești aprinsă pentru generațiile viitoare.

Adriana Simionescu, mica nepoată: Daddy

Decembrie 1999

S-a scris mult, poate totuși nu destul despre remarcabila activitate științifică a celui care a fost Nicolae Simionescu, dar s-a scris puțin despre el ca om. De aceea, mă bucur foarte mult că dl. Ion Longin Popescu s-a gândit să scrie o carte despre bunicul meu și îi mulțumesc mult că mi-a dat ocazia să scriu și eu câteva rânduri despre ceea ce reprezintă viața lui pentru viața mea.

Îl iubeam foarte mult, așa cum o nepoată poate iubi un bunic, dar între noi exista o legătură sufletească mult mai strânsă: era altceva, era ceva mai mult, mai special. Îl iubeam ca pe un bunic, dar în același timp îl admiram și îl respectam datorită realizărilor sale științifice. Eram mândră că un om atât de deosebit era bunicul meu și că aveam așa o relație specială cu un om pe care toată lumea îl cunoștea, îl aprecia și îl admira.

Cele mai frumoase momente petrecute alături de bunicul meu au fost vizitele la București în fiecare vacanță: vacanțele de iarnă cu sărbătorile de Crăciun, cele de primăvară cu sărbătorile de Paști și cele de vară cu excursii în Grecia.

De fiecare dată mă duceam cu plăcere la București, știind că în acele superbe zile petrecute cu bunicul meu îmi voi încărca sufletul și mintea cu cunoștințe noi, cu senzația înălțătoare că trăiesc clipe în care nicăieri în altă parte nu aș vrea să fiu.

Una din aceste vizite a fost cea din vara anului 1993, înainte de a pleca în Grecia. Atunci, ca și în cadrul celorlalte vizite, s-a purtat minunat cu mine, chiar și cu mici amănunte, banale, dar de care acum îmi amintesc cu mult drag: eram la masă, vorbeam, am adus pâinea și mi-am luat două felii, s-a uitat la mine cu dragoste și mi-a spus, cu multă căldură în glas: ”Ia-ți mai multă pâinică, iubită! Las că în Grecia mâncăm noi doi niște iaurt...” Aceste cuvinte mi-au rămas în minte și în suflet și nu le voi uita niciodată.

Tot în același an, de Crăciun, țin minte cum, cu drag, am cumpărat cadouri pentru restul familiei, care le-au produs mare bucurie. Daddy a fost foarte bucuros și încântat, și toți eram fericiți să fim împreună. Am

decorat cu toții pomul, am mâncat clătite flambate, am ascultat colinde cântate de Elvis Presley pe casetă, și astfel s-a creat o atmosferă deosebit de plăcută.

Ne-am uitat apoi la diapozitive de când tatăl și unchiul meu erau mici. Ne-am amuzat grozav și am observat că Daddy era fascinat de aceste frumoase amintiri și foarte bucuros că le avea. Toți eram, de altfel.

La masă, mi-a spus ”Scumpă, ia adu tu niște...”, iar apoi, de ziua mea, toți mi-au cântat ”La mulți ani!” și Daddy era mândru de mine, văzându-mă cum suflam lumânările și tăiam tortul. Când am ciocnit cu șampanie, mi-a spus: ”La mulți ani, iubito!”, și mi-am dat seama că era bucuros să fie alături de mine de ziua mea și mândru de ”iubita” sa.

Mi-aduc aminte cu drag de o zi din iulie, când Maya și Daddy au fost în vizită la noi, la Târgu Mureș; ne-am așezat amândoi la pian și, după ce i-am cântat ”Für Elise” de Beethoven, după partituri (și cu puține greșeli), bunicul mi-a cântat Chopin foarte bine (mie mi s-a părut perfect), foarte frumos și fără partituri. Avea un adevărat talent. M-a impresionat. Îl priveam cu admirație, dar și cu multă bucurie, mare dragoste și mândrie.

La București, iar apoi în Grecia, mă bucuram să fiu alături de el, mă fascina toată ființa lui, chiar și mici detalii de comportament, felul de a vorbi și umorul său extraordinar, pe care nu și-l pierdea niciodată. Era bun, generos, cu o extraordinară căldură sufletească și un deosebit optimism. Tot timpul dăruia gânduri, idei, zâmbete, se dăruia pe sine. Era mândru de realizările băieților și chiar de ale mele de la școală, lucru care mă făcea să vorbesc cu plăcere despre ele.

Era modest, nu se lăuda niciodată cu ceea ce a făcut pe plan profesional, ci doar ne povestea ca și cum ar fi fost ceva banal, dar nu era deloc așa, toți știam acest lucru. Noi îi cunoșteam realizările și, poate, dintre toate, cele mai mari sunt înființarea în 1979 a Institutului de Biologie și Patologie Celulară (IBPC) din București, care azi îi poartă numele, precum și a Societății Naționale de Biologie Celulară (SNBC) în 1982. Și pentru că am ajuns aici, vreau să spun că și eu particip la simpozioanele organizate în fiecare an de SNBC, de la vârsta de 5 ani. Chiar dacă atunci nu știam ce înseamnă această societate, mă duceam să-l văd pe bunicul și eram mândră de el, când îl vedeam îmbrăcat într-un costum oficial, ținând un discurs la un pupitru sau prezentând o lucrare.

Vacanțele din Grecia au fost cele mai frumoase vacanțe, și cu siguranță voi păstra amintiri de neuitat din verile acelor trei ani: 92, 93 și 94. Parcă doar atunci am început să-l cunosc mai bine și relația mea cu el a început să se consolideze. Au fost niște vacanțe extraordinare; nici nu visam la acea vârstă, să ajung în locuri unice ca acelea, de care acum

mă leagă amintiri foarte dragi. Din prima excursie în Grecia (Halkidiki, 1992) a început să-mi spună: ”SWEETY” (Dulceață), iar eu lui ”DADDY”, cuvinte de alint care au fost și au rămas numai între noi și care arătau că ne iubim foarte mult și că între noi exista ceva special. El a fost și rămâne ”Daddy” al meu și numai al meu, iar eu voi fi mereu ”Sweety” doar pentru el. Înainte îmi spunea ”IUBILULĂ”, pentru că mă iubea foarte mult și pentru că eram ca o libelulă: înaltă, slabă, gingașă și foarte săltăreață.

În orașul în care am stat, Hanioti, un oraș mic în peninsula Halkidiki, am făcut primele mele poze color cu Daddy și cu Maya în fața hotelului Sousouras, unde eram cazați. În 92, în fiecare zi ne-am dus cu bicicleta pe mare, pe plajă am cules scoici, am înălțat un zmeu foarte frumos și colorat, ne-am jucat cu o minge gonflabilă care era ca globul pământesc, pe care o primisem de la Daddy. Am jucat tenis în fiecare seară, lucru ce ne făcea mare plăcere tuturor. În drum spre Hanioti am găsit o broască țestoasă foarte drăguță, cu care ne-am jucat și de care am fost încântați, în special Daddy și cu mine.

În drum spre Grecia și înapoi, era mereu în fața noastră Peugeout-ul lor maro închis, metalizat, cu nr. 5-B-1776. Mașina îmi era foarte dragă. În același an am fost la Peștera, unde ne-am simțit foarte bine împreună. În săptămâna petrecută acolo, au fost multe zile însorite, dar și unele ploioase. Când era vreme bună, stăteam pe lângă cabană, admiram munții înalți împăduriți, stând la soare sub un nuc, întinși pe iarbă, prăjind carne la grătar sau escaladam munții.

Am avut și aventuri; de exemplu, într-o zi ne-a prins ploaia când eram pe munte; ne-am adăpostit, iar când s-a oprit ploaia am pornit, veseli, prin iarba udă, spre cabană, dar ne-am urzicat la picior și ne-am spălat apoi la un izvor. Am ajuns teferi la cabană și am stat toți în holul cabanei, pe o pătură mare, cu perne mici sub cap, întinși pe spate, cu picioarele pe jumătate ieșind din cabană.

În 1993 am fost la Meteora, unde, în urmă cu peste 600 de ani, călugării au construit mănăstiri pe vârful unor stânci, pentru a fi izolați de lume. Și tot din acest motiv, se deplasau și își transportau materialele de construcție și mâncarea de jos, de la alți călugări, cu ajutorul unui coș enorm tras pe o sfoară foarte groasă. Aveau o întreagă instalație pentru asta, care azi nu se mai folosește, datorită faptului că s-au construit peste 100 de scări de jos până la intrarea în mănăstire.

Priveliștea era superbă, ca și interiorul mănăstirilor; am vizitat mănăstirea Varlaam, una dintre cele mai frumoase și mai cunoscute. Înăuntru, pe lângă instalația pentru mișcarea coșului, sunt icoane aurite, cruci de argint de diverse mărimi, iar pereții sunt pictați cu icoane în culori

superbe. La poalele acestor stânci se găsesc acum chioșcuri cu suveniruri, vederi și cărți despre Meteora. Acest loc este, cred eu, unic nu numai în Grecia, ci și în lume.

De acolo, cu un vapor mare unde sus erau oamenii, iar jos mașinile, am ajuns în Insula Corfu. Acolo am făcut baie în piscină și în marea curată, caldă și de un albastru superb, în care ne-am uitat cu vizorul la pești. Am făcut plajă la așa-numitele ”coves”, care sunt porțiuni de plajă de aproximativ 10 m, aflate între stânci, așadar o combinație între mare și munte. Nu mai văzusem așa ceva în viața mea până atunci. Mi s-a părut extraordinar. Am cules scoici pe malul mării cu Daddy și am privit apusul de soare de pe balconul camerei ce dădea spre mare; ne-am jucat *beachball* pe plajă cu el, pe o vreme superbă, cu picioarele în marea cu valuri. Eram foarte fericiți, parcă fără nicio grijă, iar eu mă simțeam grozav în preajma bunicului meu. Acesta m-a învățat să joc și să iubesc tenisul, astfel încât și acum, după atâția ani, de fiecare dată când joc, îmi amintesc de acele zile care mi-au făcut mare bucurie prin faptul că învățam să joc tenis alături de Daddy.

Peste tot unde mergeam eram cu Daddy de mână, tot timpul ne îmbrățișam, glumea cu mine și eram mereu cu gura până la urechi, foarte fericită. Serile mergeam la taverne, unde dansatori în costume tradiționale dansau dansuri grecești. Și cel mai interesant a fost într-o seară, când un grec a dansat ținând colțul unei mese între dinți, și între timp se mai și învârtea, își ridica picioarele, dansa în toată regula. Mi s-a părut extraordinar!

Tot în 1993, în Corfu, am sărbătorit ziua aniversării de căsătorie a lui Daddy și Maya și ziua lui de naștere. Pentru aniversarea lor, le-am cumpărat o farfurie de pus pe perete pe care scria ceva drăguț în grecește, și o felicitare, de care s-au bucurat foarte mult. De ziua lui, Daddy a primit de la mine și Maya o cană foarte drăguță de ceai, iar de la mine și părinții mei, un jerseu alb, care îi stătea foarte bine. Cadourile noastre i-au plăcut foarte mult.

În 1993 ne-am întors din nou la Hanioti, unde ne-am simțit ca acasă. Ne-am plimbat într-un parc cu flori superbe roz, mov și albe. Acolo am jucat baschet și tenis, am mâncat pentru prima dată fistic, salată grecească și înghețate străine, pe băț, foarte bune, ce la noi în țară nici nu existau atunci.

Am fost și la Fillipi, unde am văzut ruinele unei așezări antice: coloane, amfiteatru, săli pentru diverse activități. Am vizitat și Peștera Perama, care este una din cele mai cunoscute și mai interesante peșteri ale Greciei. În drum spre casă, ne-am pierdut unii de alții la

Sofia, și nu ne-am găsit decât la București.

În 1994 am fost în Porto Carras, o stațiune superbă din sudul peninsulei Sithonia. De pe balconul blocului vedeam marea, piscina, parcul și terenurile de tenis și de golf. Acolo am fost împreună la plajă, am jucat volei, beachball și am cules scoici și pietre cu Daddy.

De la Neos Marmaras, un oraș foarte drăguț din apropiere, am cumpărat un coș și o minge mică de baschet și câte un obiect rotund de ceramică cu model de pus paharul pe el pentru mine și pentru Daddy. Îl mai am și azi. În drum spre casă, s-a întâmplat răul cel mare: infarctul lui Daddy. Când era în spital, la Serres, i-am scris bilețele cu mici mesaje (îi doream să se facă bine curând), i-am desenat flori și soare, i-am scris câteva din frumoasele proverbe în engleză, pe care le-am învățat chiar de la el (cum ar fi: ”An apple a day keeps the doctor away”), i-am pictat vitralii. Am făcut toate cu multă dragoste și răbdare, știind că totul va fi bine.

Tot drumul până la București m-am bucurat să văd mașina lor în fața noastră. Asta mă liniștea, îmi dădea siguranță și mă bucura în același timp, pentru că știam că ei se află în acea mașină, pe care o iubesc foarte mult.

Crăciunul din 94 a fost ultimul Crăciun petrecut cu el cel mai frumos Crăciun din viața mea. Daddy, mama și cu mine am decorat pomul cu globuri, jucării, steluțe sclipitoare și beteală de toate culorile. A fost cel mai frumos brad împodobit ce l-am văzut vreodată. Unchiul meu a fost Moș Crăciun și Daddy i-a spus o poezie lui Moș Crăciun, apoi am cântat toți ”o, brad frumos!” stând în jurul pomului. Am primit cadouri foarte frumoase, ne-am bucurat toți foarte mult de ele și de faptul că eram împreună și puteam să ne dăruim unii altora cadouri cu dragoste și bucurie. Toată atmosfera din seara de 24 a fost extraordinară, toți eram deosebit de bucuroși și veseli, iar Daddy era deosebit de drăguț și glumeț. Toți eram foarte fericiți. Am primit cadou de la el și Maya un poncho și un set, brățară și inel, aduse de la Paris.

Pe 25 a fost ziua tatălui meu și a primit un jerseu gri foarte elegant, de care chiar avea nevoie. A doua zi, de ziua mea, am primit un costum albastru, pantaloni și bluză. Am fost cu Maya și Daddy la magazinele de la World Trade Center și la cel al lui Mihai Stănescu. Ne-ar fi cumpărat orice doream, dar deja primisem tot ce aveam nevoie; cadourile noastre de Crăciun au fost lucruri foarte frumoase și utile, de care chiar aveam nevoie.

În noaptea dintre ani, număram secundele până la ora 12 și la fix am ciocnit cu șampanie și ne-am pupat, urându-ne ”An Nou Fericit!”

Pe data de 1 ianuarie 1995, Daddy și cu mine am făcut o plimbare până la alimentara din colț. M-am dus și eu cu el, pentru că voiam să

petrecem cât mai mult timp împreună și pentru că în preajma lui mă simțeam... mi-e greu să descriu cum, dar parcă rămâneam blocată; îmi ajungea să-l ascult vorbind. Nu-mi trebuia nimic mai mult. Mă fascina felul său de a vorbi în general, dar când mi se adresa mie cu formule de alint, de dragoste (Sweety, Scumpă, Iubito sau Iubilulă) sau cu câte o glumă, eram în culmea fericirii.

Așadar, în timpul plimbării cu el, m-am simțit extraordinar de bine și m-am bucurat că și lui îi plăcea să fie cu mine; îmi dădeam seama ce noroc aveam cu un asemenea bunic nemaipomenit, care îmi oferea toată dragostea lui. Așa cum mi-am notat atunci în jurnal, a fost o plimbare de vis, în care am vorbit mult, am râs împreună și mi-aș fi dorit ca plimbarea aceea să nu se mai termine niciodată. Aveam atâtea să-i spun, dar am ajuns prea repede acasă, unde Maya s-a bucurat foarte mult de florile aduse de noi pentru ea.

Totul are un sfârșit; în ultima seară petrecută cu el, care a fost pe 2 ianuarie 1995, stăteam toți la masă și la un moment dat, mama i-a spus că ne-am luat bilete să plecăm a doua zi la Târgu Mureș, și atunci Daddy a zis, uitându-se la noi: ”Da vouă cine v-a dat voie să plecați?”, lucru care mi-a demonstrat ce mult ținea la noi, ceea ce m-a făcut să-mi pară și mai rău că trebuia să plec (că-mi părea destul de rău și așa). A doua zi, la gară, vorbind Daddy cu mama mea, nu știu despre ce, am auzit doar atât: ”Și ce mai nepoțică...!” și asta m-a lăsat fără grai. Am fost foarte impresionată.

Până acum nu-mi venea, și nici acum nu-mi vine să cred că nu mai e. Întotdeauna, vacanțele petrecute la București erau extraordinare datorită lui și faptului că eram toți împreună.

În fiecare an, de Crăciun, mergeam arzând de nerăbdare la București, știind că el e acolo. Încă și acum îmi aduc foarte bine aminte acea mohorâtă dimineață de 6 februarie 1995, când a sunat Maya cu o voce foarte schimbată, foarte ciudată, dar n-a vrut să-mi spună nimic. Mi-a cerut doar noul număr de telefon al tatălui meu de la serviciu. O oră mai târziu, părinții mei au venit acasă, zicând că pleacă la București și mi-au spus ce s-a întâmplat. Nu mi-a venit să cred, dar în următorul moment am insistat să plec și eu. Nu-mi păsa că lipsesc de la școală, nu-mi păsa de nimic. Vroiam să fiu acolo.

Zilele ce au urmat au fost îngrozitoare, nu îndrăzneam să zic nimic, nu știam ce să spun, când toți plângeau în jurul meu. Și eu plângeam, dar nu cu lacrimi ce se vedeau, ci cu lacrimile sufletului; n-am plâns nici la înmormântare. Am încercat să mă țin tare. N-am vărsat nicio lacrimă. Dar, când am ajuns acasă, am fugit sus în dormitor și, fiind singură, nu m-am putut abține și am plâns mult, mult. Astfel am simțit că m-am

descărcat. Ca să nu bănuiască nimeni nimic, mi-am spălat ochii roșii și am coborât. N-am mai putut rosti niciun cuvânt toată ziua.

Au trecut patru ani de când, de Crăciun mă duc mai tristă, că cineva lipsește. Și oricât de fericiți am fi toți împreună, nu mai e la fel. Acum, la București, în acea frumoasă casă mereu plină de veselie și bucurie, totul e mai trist. Totuși, parcă spiritul lui e pretutindeni, în toate camerele și, câteodată, nu știu cum, aștept să vină Daddy de sus, din dormitor, la cină. Știu că nu e posibil și atunci încerc din răsputeri să fac ca atmosfera să fie mai veselă, dar nu prea reușesc.

E bine, totuși, că suntem toți împreună (sau ce-a mai rămas din familie), măcar în vacanțe sau de sărbători. Daddy a fost un om extraordinar, moartea lui este o mare tragedie, o mare nedreptate. Nici acum nu înțeleg de ce a trebuit să i se întâmple tocmai lui, un om atât de deosebit. Poate Dumnezeu a vrut să ne pedepsească; dar pentru ce? Pentru că eram prea fericiți împreună? Nu știu, nu-mi pot explica. Se spune că ”Totul are un sens” și că ”Tot răul e spre bine”, dar în acest caz, nu știu ce să mai cred. Nu pot să fac nimic, nici să schimb nimic, nimeni nu poate; singurul lucru ce-l pot face este să nu uit nimic din ce m-a învățat, să prețuiesc fiecare zâmbet pe care mi l-a dăruit, fiecare moment excepțional petrecut cu el, fiecare amintire, fiecare carte sau alt cadou primit de la el, fiecare fotografie de-a lui, fiecare carte scrisă de el, fiecare rând și cuvânt scris de el, fiecare gând al altora despre el, fiecare lucru nou pe care-l mai aflu despre el, ce poate nu l-am înțeles la vârsta mea de atunci, fiecare persoană pe care știu că a iubit-o el.

Și mai pot să fac ceva: să încerc să fiu cum ar fi dorit el; indiferent ce drum și ce meserie îmi voi alege, îi promit să fiu așa cum am înțeles de la el: o luptătoare, să nu-mi pierd curajul și entuziasmul în fața piedicilor, să nu-mi pierd dorința de a învinge și de a fi printre cei mai buni.

Îmi pare rău că l-am pierdut, când mai aveam atâtea lucruri de învățat de la el, când poate și eu aș fi putut să-i ofer atâtea bucurii, dar cred că trăind așa cum m-ar fi învățat el, pot să-l fac să-mi zâmbească de acolo de sus.

George E. Palade :

NICOLAE SIMIONESCU - O VIZIUNE EXIGENTĂ, DAR LUMINOASĂ, PENTRU VIITORUL ŞTIINŢELOR BIOMEDICALE ÎN ROMÂNIA

Evenimentul tragic al sfârşitului neaşteptat şi prematur al vieţii unui om ajuns pe culmile cele mai înalte ale activităţii sale crează condiţiile ce dezvăluiesc adevărata măsură a valorii sale. Zgomotul de fond ce însoţea activităţile lui zilnice este înlocuit de tăcere, iar relaţiile complexe de ambiţii şi interese comune sau opuse fac loc unui gol pe care se proiectează în lumină puternică, într-un contrast izbitor silueta celui dispărut.

Nicolae Simionescu a murit subit în somn, răpus cu blândeţe de boala pentru studiul căreia şi-a dedicat o mare parte din viaţă. El era într-adevăr ajuns pe vârful remarcabilei lui cariere în cercetarea biomedicală. Prin trecerea lui din viaţă, atât el, cât şi comunitatea ştiinţifică românească au pierdut realizarea multor idei ce încă germinau în mintea lui. Nu putem măsura pierderile, dar putem evalua realizările avute înainte de plecarea sa bruscă şi putem accepta cu respect şi veneraţie moştenirea pe care a lăsat-o comunităţii româneşti.

Educaţia

Nicolae Simionescu a fost produsul sistemului de educaţie românesc din perioada interbelică. A absolvit Liceul „Sf. Andrei” în 1944 şi, în acelaşi an, a intrat la Facultatea de Medicină „Carol Davila” a Universităţii din Bucureşti, ale cărei cursuri le-a urmat într-o perioadă de rapide şi drastice schimbări politice şi sociale, cauzate de comunizarea şi satelizarea treptată a ţării de către politica oarbă şi implacabilă a Sovietelor. Mulţi români au fost captaţi de puterea roşie, dar mulţi, precum el, au reuşit să-şi păstreze un „status intern” şi o imagine a ceea ce trebuie să facă pentru a nu pierde respectul de sine.

Începuturile activității de cercetare

Încă de pe băncile facultăţii, Nicolae Simionescu a lucrat ca intern/rezident în chirurgie, iar după absolvire, preparator la Clinica de Chirurgie a Prof. Dr. Ion Juvara. Judecând după viile lui amintiri legate de muncă, aventurile şi poznele din această clinică, e cert că a avut o perioadă de activitate minunată în acel serviciu.

În aceeaşi perioadă lucra şi la Catedra de Anatomie ca preparator, apoi ca asistent universitar şi aici, animat de curiozitatea înnăscută a omului de ştiinţă în devenire, a studiat şi prezentat o serie de particularităţi în organizarea vasculaturii unor organe ca splina, rinichiul şi pancreasul.

În 1957, s-a mutat de la chirurgie la Institutul de Endocrinologie - condus la vremea aceea de Ştefan Milcu - ca cercetător principal şi conducător al Secţiei de Morfologie. În perioada aceea, curiozitatea lui înnăscută s-a concentrat pe câteva subiecte bine alese, iar rezultatul s-a concretizat într-o serie de lucrări importante asupra glandei suprarenale şi o monografie publicată în Anglia, asupra morfologiei normale şi patologice a glandei tiroide.

La Institutul de Endocrinologie, Nicolae Simionescu a întâlnit-o pe Maya, o remarcabilă tânără cercetătoare de sine stătătoare, care a devenit colaboratoarea lui constantă şi, mai târziu, soţia lui.

În 1966, după mai mult de 20 de ani de la plecarea mea din România, m-am întors în ţara mea de origine, ca membru al unei delegaţii a Academiei Naţionale de Ştiinţe a Statelor Unite, pentru a negocia o înţelegere de schimburi ştiinţifice cu Academia Română. În acea perioadă, guvernul comunist al României încerca să obţină o imagine de independenţă faţă de Uniunea Sovietică prin deschiderea unor ferestre către vest.

Viaţa era încă grea în România, dar cel puţin era evident la orice nivel, de la oficialităţile guvernamentale, la profesorii universitari şi la cetăţenii de rând, că românii erau hotărâţi să-şi afirme şi să-şi apere identitatea naţională, erau pregătiţi să recunoască existenţa unor gradiente economice şi ştiinţifice, să încerce să stabilească contacte cu restul lumii, dincolo de consideraţiile doctrinelor politice.

Perioada Rockefeller

Am socotit că laboratorul nostru la Universitatea Rockefeller ar putea încuraja această „deschidere către vest" şi am hotărât să invit un cercetător român tânăr să lucreze în grupul nostru, la New York. Îl cunoşteam pe Nicolae Simionescu din perioada studenţiei şi i-am cerut sfatul vechiului meu prieten şi coleg de clasă, Ion (Cuti) Juvara; răspunsul lui fiind entuziast, l-am invitat pe Nicolae Simionescu să vină la Universitatea Rockefeller. El a acceptat fără întârziere, cu toate că postul pe care-l puteam oferi - asistent de cercetare - era cu câteva trepte sub poziţia de conferenţiar pe care o avea la Bucureşti.

În perioada aceea, laboratorul de Biologie Celulară al Universităţii Rockefeller era la apogeul activităţii lui, care începuse spre sfârşitul decadei 1940 şi a progresat în mod impresionant în decadele următoare. În acel laborator, care a fost recent descris ca „leagănul biologiei celulare moderne", Nicolae Simionescu s-a alăturat generaţiei lui Gunter Blobel, David Sabatini, Marilyn Farquhar şi James Jamieson, actualii conducători ai biologiei celulare americane. El li s-a alăturat cu uşurinţă şi graţie, chiar dacă majoritatea noilor săi colegi aveau dificultăţi la pronunţarea numelui. Adeseori suna mai mult ca Simonoseki decât Simionescu.

Studiul endoteliului continuu

Împreună am decis să studiem organizarea şi funcţiile endoteliului vascular, în mod deosebit a endoteliului continuu din musculatura corpului, din inimă şi plămâni. Rezultatele anterioare ale laboratorului duseseră la descoperirea unor noi structuri denumite vezicule plasmalemale, iar studiile efectuate în anii 1960 sugeraseră implicarea lor în transportul macromoleculelor (feritină), prin stratul endotelial al peretelui vascular. Dar multe rămăseseră de făcut pentru a defini în detaliu structura capilarelor sanguine şi a altor segmente ale microvasculaturii şi pentru a cerceta mai departe funcţia veziculelor plasmalemale.

Acest domeniu a devenit feuda ştiinţifică a lui Nicolae Simionescu. Lucrul a demarat prompt şi a progresat repede, dar exista totuşi un element care afecta dureros situaţia generală: Maya Simionescu era încă

în Bucureşti. O serie de cereri insistente au reuşit, în final, să o aducă la Universitatea Rockefeller, fapt ce a însemnat încă un asistent de cercetare român şi un progres mai rapid al proiectului nostru. De asemenea, a însemnat fericire.

Nicolae şi Maya Simionescu s-au instalat în campusul Universităţii şi munceau febril zi şi noapte (sau cel puţin până seara târziu) pentru a face faţă competiţiei formidabile din domeniul nostru de cercetare.

Pe de o parte, specialiştii în fiziologia capilarelor, care dominau intelectual scena - pretindeau că toate schimburile transcapilare aveau loc prin pori situaţi de-a lungul joncţiunilor intercelulare şi considerau alternativa transportului prin vezicule plasmalemale ca foarte puţin probabilă, dacă nu chiar imposibilă.

Pe de altă parte, uneltele de lucru şi procedurile experimentale existente la acea vreme nu erau suficient de rafinate pentru a produce rezultate acceptate şi convingătoare pentru biologii celulari. Nicolae Simionescu a utilizat o serie de trasori de diferite dimensiuni, toţi fiind selectaţi pentru detecţia porilor mici, postulaţi de specialiştii în fiziologia capilarelor, deoarece aceşti pori erau, în acea perioadă, principalul obiect de interes. Fundamentarea studiilor era clară şi adeseori elegantă, dar competiţia a rămas neconvinsă.

Descoperirea canalelor transendoteliale

Studiile efectuate în acea perioadă au produs totuşi un rezultat satisfăcător, important: descoperirea canalelor transendoteliale formate de vezicule plasmalemale fuzionate simultan cu ambele feţe (luminale şi abluminale) ale plasmalemei endoteliale. Existenţa acestor canale a fost stabilită în mod convingător de Nicolae Simionescu. De asemenea, importante au fost studiile lui, în care a identificat segmentele diferenţiate ale microvasculaturii din diafragm şi a descoperit joncţiuni deschise focale în endoteliul venulelor postcapilare.

Perioada Universitatii Yale

În 1973 grupul nostru, inclusiv Nicolae şi Maya Simionescu, s-a mutat de la Rockefeller la Yale Medical School, unde a pus bazele unei noi Secţii de Biologie Celulară. Studiile asupra vaselor sanguine au continuat fără întrerupere în aceste noi laboratoare. Lucrările lui Nicolae

Simionescu s-au focalizat clar pe endoteliul vascular dar, aşa cum era de aşteptat din partea unui om de ştiinţă cu adevărat plin de resurse, cercetările lui au acoperit un spectru larg de teme, începând de la tehnici noi de fixare a ţesuturilor şi mordansare (cu galoilglucoză) pentru obţinerea unui contrast optim, la noi trasori (particule de dextran şi glicogen), la încercări reuşite de a izola microvasculatura din miocard mergând până la noi tehnici de studiu a joncţiunilor intercelulare (replici de specimene obţinute din îngheţare-fracturare). Toate aceste studii experimentale au fost efectuate în colaborare cu Maya Simionescu, care adeseori a fost prim-autor.

La acea vreme, Nicolae şi Maya erau deja recunoscuţi ca biologi celulari de frunte, specializaţi în studiul endoteliului vascular, şi în această calitate reprezentau laboratorul nostru la diferite conferinţe şi întâlniri în Mexic şi Japonia.

Ceea ce era remarcabil, este faptul că de îndată ce schiţam un domeniu de cercetare, studiile erau rapid şi eficient realizate şi extinse până la limita permisă de tehnologia zilei. Aşa s-a întâmplat în cazul joncţiunilor endoteliale şi al câmpurilor vasculare bipolare în diafragm. Şi tot aşa s-a întâmplat, câţiva ani mai târziu, când au fost descoperite microdomeniile diferenţiate ale plasmalemei endoteliale.

Un nou institut în Bucureşti

După mutarea la Yale, o altă preocupare majoră a intrat în viaţa lui Nicolae Simionescu, fiindcă el socotea că un Institut de Biologie şi Patologie Celulară trebuie şi poate fi realizat la Bucureşti. Modelele lui au fost cele două laboratoare de biologie celulară în care a lucrat în Statele Unite (Universităţile Rockeffeler şi Yale) şi Institutul Internaţional de Biologie şi Patologie Celulară fondat de Christian de Duve în Belgia.

Astfel, printre experimente, descoperiri de noi trasori, selecţionări de microfotografii şi redactări de manuscrise, Nicolae Simionescu a început să lucreze la planurile unui nou laborator care urma să fie construit în Bucureşti. Iniţiativa i-a aparţinut în întregime. Rolul meu în acest nou proiect a fost de a găsi, împreună cu el, căile şi mecanismele care să asigure viabilitatea acestui Institut în România.

De la început a fost nevoie de o legătură oficială cu o universitate americană. Yale Medical School a devenit partenerul american, iar Universitatea din Bucureşti cel român. Apoi, a fost necesară realizarea şi semnarea unei convenţii oficiale între cei doi parteneri. Obiectivul

principal era prevenirea izolării şi asigurarea unei colaborări continui. Convenţia prevedea ca Nicolae şi Maya Simionescu să funcţioneze anual câte trei luni la Yale, participând la activitaţi didactice şi de cercetare, şi nouă luni la Bucureşti, la noul institut.

Planurile au fost definitivate, convenţia a fost semnată şi institutul a fost construit, bine echipat şi inaugurat în 1979. Mai mult decât atât, folosindu-şi bine noile relaţii ştiinţifice din Statele Unite şi profitând de disponibilitatea Burselor Fullbright, Nicolae Simionescu trimisese deja un prim grup de tineri români, bărbaţi şi femei, pentru a se perfecţiona în laboratoare de frunte în străinătate, în domenii alese cu multă atenţie. Ei s-au întors la Bucureşti gata pentru începerea activităţii în propriul lor Institut.

Microdomenii diferenţiate

În primii ani, lucrurile păreau să meargă fără dificultăţi. Nicolae şi Maya au organizat o excelentă echipă de lucru în România, şi au putut să sosească la timp la Yale pentru a-şi îndeplini obligaţiile ca profesori asociaţi (visiting professors). Amândoi s-au dovedit a fi excelenţi dascăli, atât în laborator, cât şi în sălile de curs. Mai mult decât atât, studiile experimentale la Yale s-au îndreptat în direcţii noi, interesante şi promiţătoare.

Au fost descoperite microdomenii diferenţiate pe aspectul luminal şi abluminal al plasmalemei endoteliului fenestrat şi continuu, folosind ca probe feritina cationizată şi diferite lectine, şi parte din moleculele implicate în aceste diferenţieri au fost identificate în urma tratamentelor cu enzime specifice. Elementul cel mai important în aceste noi descoperiri a fost faptul că aceste microdomenii diferențiate chimic, corespundeau unor elemente structurale bine definite. Mai mult, rezultatele au sugerat clar că veziculele plasmalemale au compoziţia chimică de suprafaţă necesară pentru a transporta proteine plasmatice, cunoscute ca fiind în majoritatea lor specii de tip anionic.

Proiectul privind domeniile microdiferenţiate a fost un alt exemplu de activitate dusă la bun sfârşit, prompt şi cu mare eficienţă de către Nicolae şi Maya Simionescu. La Universitatea Yale şi la IBPC, proiectul acesta a fost aprofundat şi extins şi la alte tipuri de endotelii. Acelaşi protocol de bază a fost aplicat pentru localizarea receptorilor pentru histamină pe suprafaţa endotelială, folosind conjugate de histamină-feritină.

În loc de concluzii

Nicolae Simionescu a avut o carieră meteorică. În zece ani, pornind cu o inteligenţă sclipitoare şi de la o educaţie generală valoroasă, a devenit o autoritate deplină şi unanim recunoscută în biologia celulară a endoteliului vascular. În decada următoare şi în continuare, în condiţii sociale şi politice nesigure şi dificile, a organizat un Institut de cercetare şi a pregătit o întreagă echipă de cercetători capabili, iar în următorii cinci ani şi-a asumat o poziţie de conducere în Academia Română, cea mai înaltă instituţie care ghidează activitatea de creaţie a ţării. În fiecare etapă, în această rapidă evoluţie, a lăsat în urmă o moştenire durabilă: realizările cercetărilor lui ştiinţifice, Institutul de Biologie şi Patologie Celulară - două generaţii de cercetători bine pregătiţi - şi o exigentă, dar luminoasă viziune asupra viitorului ştiinţelor biologice şi biomedicale în România.

Guido Majno:

NICOLAE SIMIONESCU A FOST UN CETĂŢEAN AL PLANETEI, DAR EL A FOST ÎN PRIMUL RÂND ROMÂN PRIN TOATĂ FIINŢA SA, PÂNĂ LA ULTIMA SA CELULĂ

Simionescu a fost un cetățean al lumii (Prof. G. Majno), ceea ce era în totală contradicție cu ideologia național-comunistă de la București. Cu statura sa științifică ”transfrontalieră”, a fost, poate, singurul savant român care trebuia să-și schimbe pașaportul o dată la doi-trei ani, din lipsă de spațiu pentru vize.

Fiecare plecare a sa făcea să se încrunte multe frunți ”luminate” de culturnici și generali de securitate, unda de șoc ajungând uneori până la ”cabinetul doi” al dictaturii bicefale. Deși, mai mult ca sigur, așa-zișii oficiali l-ar fi dorit ”rămas” peste granițã, să scape de răspunderea acordării ”vizei interne” – expresia neaoșă a gulagului românesc – Simionescu le încurca mereu socotelile și le tulbura liniștea întorcându-se. În plus, pentru ca sfidarea să-și atingă ”raza maximă de totalitate”, profesorul refuza categoric să dea ”raportul” asupra activității depuse în străinătate – o cutumă a deplasărilor de serviciu prin care se încerca controlul asupra cetățeanului român oriunde s-ar fi aflat pe mapamond. Nu o dată, mărunți funcționari ai CC, dar și „generalii de pașapoarte” și ditamai secretarii partidului se vor fi întrebat: ”cine îl ține în brațe pe acest doctor?”, ignorând că *prestigiul științific* era o forță de necontrolat, capabilă să spargă tiparele mizeriei din cabinetele puterii corupte.

Cineva glumea, spunând că profesorul avea un pașaport celular, eliberat chiar de… IBPC, fiindcă prea adesea își lua zborul peste granițele patriei, spre a participa la simpozioane și congrese, ori pentru a ține cursuri la cele mai mari universități.

Câteodată, mai ales în ultimii 4-5 ani ai terorii, se produceau dereglări: Nicolae și Maya Simionescu nu mai ajungeau în timp la workshop-uri sau la Yale University, fiindcă vreunui tovarăș i se năzărea că prea ”și-au luat-o în cap spionii ăștia americani!”. Atunci, în loc să-și pună viza și să dea drumul la ”lucrare”, unul ca tovarășa Pena ardea dosarelor un ”aviz negativ” și le punea la păstrare. Cum căile Domnului sunt, totuși, necunoscute, Simionești ajungeau până la urmă în America, se scuzau cum puteau în fața studenților care, desigur, nu prea înțelegeau de ce au întârziat profesorii lor preferați, colectau sute de kilograme de

substanțe, trasori și reactivi, și se întorceau, spre stupoarea americanilor, ”acolo unde le era locul”. În întreg deceniul 1979 - 1989, prin acțiunea directă a profesorilor Simionescu, IBPC a primit 15 tone de substanțe și aparatură în valoare de 450.000 dolari și grant-uri pentru cercetare, oferite de guvernul american, în valoare de peste 400.000 USD. Prin participarea directă, fie ca ”invited speaker”, fie ca organizator, visiting professor sau consultant, precum și prin calitatea de membru în cele mai prestigioase colegii editoriale și în cele mai mari societăți științifice internaționale, Nicolae Simionescu s-a aflat tot timpul în ”miezul fierbinte” al vieții academice mondiale, fiind el însuși un reper important pentru mii de cercetători din întreaga lume.

Îmi vine greu să cred că mă aflu în situaţia de a-mi aşterne în scris gândurile pentru comemorarea lui Nicolae Simionescu. Ce pierdere teribilă pentru România, pentru ştiinţă, pentru nedespărţita sa Maya, şi pentru acei nenumăraţi dintre noi care l-au iubit şi admirat! Nu mi-aş fi putut închipui vreodată că poate exista o lume fără el, în aşa mare măsură a făcut parte din vieţile noastre, fiind atât de necesar pentru mulţi dintre noi.

A fost o personalitate unică în multe privinţe. Pentru soţia şi colaboratoarea mea, Dr. Isabelle Joris, şi pentru mine, întâlnirile noastre anuale cu familia Simionescu, de obicei în Statele Unite, deveniseră un ritual pe care-l anticipam cu mare bucurie şi nerăbdare, ca pe o transfuzie de idei şi o posibilitate de a face o incursiune imaginară în ştiinţa viitorului. Nimic nu va putea înlocui aceste ocazii. Încercând să-mi transpun durerea în vorbe, un cuvânt îmi izvorăşte în minte: Eroism. Nicolae Simionescu ne-a lăsat un minunat exemplu de eroism în viaţa publică şi particulară. Nicolae şi Maya ar fi putut beneficia de oricare dintre confortabilele poziţii academice din Statele Unite, dar ei au ales calea cea mai dificilă, cea de a-şi ajuta propria ţară (şi iată că din nou mă surprind vorbind de Nicolae şi Maya împreună, căci într-adevăr ei formau o unitate).

Nicolae a fost un cetăţean al planetei, dar el a fost în primul rând Român prin toată fiinţa sa, până la ultima sa celulă. Şi-a consacrat întreaga energie edificării în România a unei insule de excelenţă - la nivel mondial - şi a realizat aceasta în ciuda unor enorme dificultăţi, suferinţe şi chiar pericole personale. Protejat de extraordinara sa prestanţă, de statura lui ştiinţifică şi de inspirata sa imaginaţie, s-a luptat pentru viitorul tinerilor români zi de zi, asumându-şi personal riscuri.

Din punct de vedere ştiinţific, formaţia sa a fost unică, combinând medicina experimentală, endocrinologia, chirurgia cu anatomopatologia de diagnostic - discipline pe care le-a practicat la Institutul de

Endocrinologie din Bucureşti timp de 18 ani, urmaţi apoi de alţi zece ani de pregătire în laboratorul unuia dintre fondatorii biologiei celulare, laureatul Premiului Nobel, George E. Palade. S-a îndrăgostit - ca de altfel atâţia alţii înainte şi după el -, de celulele care căptuşesc vasele sanguine şi ne separă de „oceanul nostru interior", celulele endoteliale.

Apoi, în 1979 s-a întors la Bucureşti, pentru a conduce un nou institut pe care l-a plănuit cu grijă şi l-a desemnat a fi un nou „paradis" al biologiei celulare. Credincios dublei sale formaţii de Doctor în Medicină şi de Doctor în Ştiinţe, l-a denumit Institutul de Biologie şi Patologie Celulară, singurul Institut cu această titulatură existent, după câte ştiu, în lumea întreagă. Trebuie să fi fost o experienţă inspirată, cea de a da o orientare unei echipe formate din 86 oameni, dintre care 19 foarte tineri şi însetaţi de cunoaştere, dar relativ neexperimentaţi cercetători. Acesta a fost doar începutul.

Foarte curând, grupul s-a extins la 130 membri, selecţionaţi în urma discuţiilor purtate cu peste 1300 de candidaţi. Cu 30 de ani în urmă, un alt mare cercetător, Peter Medawar, a denumit ştiinţa ca „artă a soluţiilor", înţelegând prin aceasta faptul că etapa esenţială în practicarea ştiinţei este talentul de a aborda doar acea problemă care este rezolvabilă cu mijloace accesibile.

Nicolae Simionescu a procedat întocmai şi a ales să concentreze activitatea întregului Institut asupra unei singure probleme: biopatologia celulară şi moleculară a sistemului cardiovascular şi, în particular, a endoteliului şi a rolului lui esenţial în patologie, anume ateroscleroza. A fost o alegere inspirată; nicăieri în lume nu mai există un grup atât de puternic, capabil să abordeze ateroscleroza din atâtea puncte de vedere ale biologiei celulare, incluzând biochimia, biofizica, fiziologia, patologia, culturile de ţesuturi şi microscopia electronică.

Deşi pentru comunitatea ştiinţifică internaţională el a reprezentat chintesenţa cercetătorului autentic, în viaţa particulară a găsit timpul necesar să compună muzică la pian, să picteze şi să scrie poezii, fiind şi în aceste domenii un admirabil model pentru mai tinerii săi colaboratori.

Printre darurile concrete, Nicolae Simionescu ne-a lăsat un monument viu, Institutul de Biologie şi Patologie Celulară, un Institut cu o denumire şi o misiune ştiinţifică frumoasă. Şi, mai presus de toate, pentru români şi pentru cercetătorii din întreaga lume, exemplul său de curaj lipsit de compromisuri va continua să dăinuie, căci avem nevoie de eroi mai mult ca oricând în aceste timpuri dificile în care trăim.

Prin dispariţia sa, România a pierdut pe unul dintre cei mai distinşi fii ai săi, dar în acelaşi timp s-a îmbogăţit cu o valoroasă moştenire.

Nicolae Cajal:

NICOLAE SIMIONESCU ESTE ȘI VA CONTINUA SĂ FIE CU NOI

("Academica", ian. 1996)

La comemorarea colegului și prietenului Nicolae Simionescu, deși este greu de conceput că el nu mai este fizic printre noi, ne dăm seama – pe de o parte cât ne lipsește, cât de mult lipsește științei românești, Academiei Române, Secției de Științe Medicale și Academiei de Medicină, iar pe de altă parte, că prin ceea ce a realizat el este și va continua să fie aici și în lumea științifică națională și internațională mereu. Cercetător științific talentat nativ și prin muncă asiduă în domeniile anatomiei, medicinei experimentale, morfopatologiei și mai ales în domeniul biologiei moleculare, Nicolae Simionescu a realizat un foarte mare număr de lucrări publicate în țară și mai ales peste hotare, foarte multe din descoperirile sale fiind preluate de literatura de specialitate, la multe din ele fiind asociat numelui său și cel al remarcabilei sale soții, Maya Simionescu.

Desigur, spațiul nu-mi permite în această scurtă evocare decât semnalarea unora din aceste descoperiri: specialiștii, istoricii de știință se vor apleca desigur mulți și mulți ani cu competență asupra lor. Voi aminti doar descoperirea receptorilor pentru albumină ai celulelor endoteliale și rolul lor în transportul transendotelial al albuminei; demonstrarea prezenței și concentrării receptorilor pentru histamină în venule; demonstrarea faptului variabilității permeabilității endoteliale în întregul arbore vascular, ca și la nivelul unei singure celule endoteliale; introducerea conceptului de "transcitoză" mediată de receptori, descoperirea liposomilor extracelulari, ca modificarea cea mai precoce a leziunilor ateriosclerotice, etc.

Dar Nicolae Simionescu a adus încă multe alte contribuții originale care au fixat puternic personalitatea sa printre marii specialiști ai lumii, mai ales în domeniul biologiei celulare.

Prof. Simionescu a fost și un mare organizator, mărturie crearea și organizarea Institutului de Biologie și Patologie Celulară, Institut care astăzi îi poartă numele și în care, împreună cu Acad. Maya Simionescu, a creat o puternică și recunoscută școală în domeniu.

În ultimul său an de viață a devenit vicepreședinte al Academiei

Române unde, continuând preocupările sale pentru îmbunătățirea cercetării științifice – în special biomedicale – românești, atât din Academia de Științe Medicale, din Secția de științe medicale a Academiei Române, cât și din Colegiul consultativ pentru cercetare aplicativă și dezvoltare, a propus și introdus o serie de măsuri și inițiative ce s-au dovedit extrem de rodnice. Din nefericire, el nu a apucat să vadă roadele semințelor, multe puse de el. Totodată, în numeroase articole, Nicolae Simionescu a luptat pentru reformă, pentru modernizarea cercetării, pentru introducerea selecționării cercetărilor pe principiul competitivității și competenței. Noianul de articole publicate îmi place să le consult adesea, îmi place să citez câteva gânduri ale sale:

”Cu cât o țară a atins un nivel mai ridicat de performanță științifică, cu atât este mai largă, mai vie și mai productivă osmoza bidirecțională dintre Comunitatea Științifică și organismele de promovare a efortului de cunoașterea și de consacrare a făuritorilor de cultură”.

”Credibilitatea sistemului în fața comunității științifice poate fi reinstaurată numai prin introducerea unui mecanism responsabil și imparțial prin care și așa puținele fonduri acordate cercetării să fie alocate prin competiție transparentă, sub evaluarea specialiștilor de valoare pe care îi are țara noastră. Fără un astfel de sistem competitiv, tinerii care vor să facă o carieră în știință vor fi dezorientați și dezamăgiți și vor continua să-și caute loc de împlinire în alte activități din țară sau de pe alte meleaguri”.

”Este de datoria autorităților de stat ca, împreună cu comunitatea științifică, să creeze sisteme manageriale prin care minților creatoare să li se ofere infrastructurile și condițiile materiale necesare pentru a produce știință de valoare. O cercetare științifică performantă stă la baza deopotrivă a culturii naționale, a progresului tehnic și economico-social, al asigurării mediului intelectual și tehnologic în care tinerii să se poată împlini, al prestigiului internațional al țării noastre.”

”O profundă criză economico-socială, dar în cadrul ei cea mai gravă este criza științei și culturii și incertitudinii supraviețuirii școlilor și a centrelor de excelență. De aceea, este esențială luarea de Decizii Politice care să ateste concret că, chiar și într-o perioadă de declin economic, sprijinirea cercetării fundamentale este o datorie morală a Statului. Investiția constantă în Științele de Bază și în formarea noii generații de oameni de știință este cea mai lucidă și mai sigură investiție în viitor. În această strategie națională, Academiei Române îi revine responsabilul rol de custode și promotor.”

Am încercat să aduc câteva gânduri la comemorarea lui Nicolae Simionescu, subliniind convingerea că moștenirea științifică ce ne-a lăsat îl va ține mereu viu.

Ion Juvara

(August 1983)

Îl cunosc pe Dr. Simionescu din 1953 când, în dorința mea de a avea colaboratori tineri și dornici de a se instrui, a fost numit în Clinica Chirurgicală pe care o conduceam. Am lucrat împreună 4 ani, tânărul doctor Simionescu distingându-se prin întreaga sa activitate ca un element ieșit din comun, poate prea bun pentru a rămâne doar un ”simplu chirurg”. Așa se face, probabil, că a trecut în cercetarea științifică fundamentală, în care i-am urmărit activitatea care a culminat prin specializarea sa în Biologia Celulară.

Institutul pe care îl conduce, conceput personal atât din punct de vedere organizatoric, cât și funcțional, precum și calitatea cercetărilor pe care le face, marchează din plin calitățile sale deosebite, pe care le-am constatat cu ocazia colaborării noastre. A știut să-și aleagă colaboratorii, a știut să-i dirijeze creând o unitate de cercetare care reprezintă o școală și un unicat în țara noastră. Vreau să subliniez, de asemenea, simțul său patriotic, în sensul creării în țara noastră a unei unități și a unei activități cu răsunet internațional.

Soția sa, Maya Simionescu, a fost și este o colaboratoare excepțională, care l-a secondat permanent în întreaga sa activitate.

Îi felicit pe soții Simionescu și le doresc mari succese în activitatea lor.

Cu veche și constantă prietenie.

Ștefan Milcu
(1996)

Institutul de Biologie și Patologie Celulară este asemănător unei opere de artă. . Nu este surprinzător că a fost realizat astfel de doi iluștrii elevi ai școlii de biologie și medicină, care au reușit să se impună prin opera lor în lumea științifică contemporană și să dețină o poziție de prestigiu. Elevilor și prietenilor Nicolae și Maya Simionescu le datorăm admirație și recunoștință, pentru tot ce au făcut și pentru tot ce vor dărui științei în anii viitori, ce-i dorim să fie îndelungați și rodnici!

„Figura lui Nicolae Simionescu reflectă o puternică personalitate răpită așa de devreme din comunitatea științifică. Un creator adevărat științific, un creator de instituții, un ideal pentru tineri care vor aspira să ajungă acolo unde a ajuns el.

La prima vizită a Profesorului G.E. Palade la Institutul de Endocrinologie, nu mi-a cerut nimic decât pe Simionescu, nu l-a interesat altceva. Nicolae Simionescu s-a reîntors în țară după o lungă absență, cu hotărârea de a construi un Institut consacrat biologiei celulare. Pe un loc viran, cu discreție, aproape în secret, a construit împreună cu Maya Simionescu Institutul de Biologie și Patologie Celulară. Este opera lui. Asemenea marilor constructori ai științei medicale românești, a introdus Biologia și Patologia Celulară în țara noastră, a lăsat poporului nostru o instituție în care se poate dezvolta știința, se poate învăța, se poate găsi noul și arăta că noi putem fi creatori. El a demonstrat din plin această capacitate.

Nu trebuie să uităm! Cei care uită sunt uitați la rândul lor.”

Constantin Popa -
Întâlnirea mea cu Profesorul Nicolae Simionescu
(”Academica”, ian. 1996)

Prima mea întâlnire cu prof. Nicolae Simionescu a avut loc în perioada studenţiei mele, întâlnindu-l ulterior în nenumărate alte situaţii. Am să-mi permit să evoc acum, câteva din aceste întâlniri. În ansamblul cunoaşterii acestei mari personalităţi umane, aceste evocări ar putea să fie neobişnuite pentru o parte din colegii care au fost în aceeaşi perioadă cu mine, studenţii Facultăţii de Medicină Generală din Universitatea “Carol Davila”, fostul Institut de Medicină şi Farmacie din Bucureşti. Înainte de toate, aş vrea să spun că încă nu este momentul să se facă o evaluare a Prof. N. Simionescu; este însă momentul în care să ne aducem aminte în fiecare an de acest mare om de ştiinţă şi mare dascăl. De o mare complexitate umană, aşa cum a definit atât de bine d-na Acad. Maya Simionescu personalitatea Profesorului, nu cred că este posibil să fie încadrată cu exactitate, el depăşind de departe tiparele vremii sale... Şi mai cred că întâlnirile anuale, în care vedem ce-am făcut şi cum ne plasăm vizavi de cel care ne priveşte acum de la distanţă, în orice domeniu al cunoaşterii ştiinţifice sunt necesare şi utile atât pentru cei aflaţi la o anumită vârstă, cât şi, mai ales, pentru cei tineri.

Eu consider că istoriceşte mai este timp să aşteptăm şi pentru faptul că Prof. Nicolae Simionescu ne demonstrează o continuitate. Este vorba astăzi de o continuitate, nicidecum o întrerupere. Prof. Nicolae Simionescu nu a dispărut. Uitaţi-vă în reviste! Dar pe de altă parte, dacă ne uităm la evoluţia sa în timp, eu cred că cercetarea ştiinţifică universală şi-a permis un mare lux şi anume acela de a folosi un om pentru cunoaşterea umană, un om care a parcurs pe riscul său personal de efort, de imaginaţie, de inteligenţă, dar mai ales riscul de sănătate, nişte etape absolut surprinzătoare de la morfolog - anatomist riguros, la anatomo-patolog, la exploraţionist, la genetician ş.a.m.d., până la cercetarea ultrastructurală într-o variantă unică.

Aş zice un parcurs ideal; ce este mai potrivit pentru un om care a parcurs întreaga biologie umană în structura sa macroscopică şi

microscopică, ani de zile, zeci de ani de zile, de la normal, cu Prof. Gr.T. Popa şi ulterior singur şi cu alţi colaboratori? Ce este mai extraordinar să fi parcurs apoi morfo-patologia în variantele sale, cu predilecţie în endocrinologie, pentru ca, în final, să realizeze o dezvoltare în aria mirifică ultrastructurală în care, îmi închipui, cu câtă dezinvoltură a pătruns, eliberat de "chinga" aceea, "coerciţia" pe care o dădea anatomia clasică pe care noi o învăţam atunci de la alţii, iar de la dânsul o învăţam cu totul şi cu totul altfel.

M-am uitat într-o carte excelent scrisă de prof. Costin Cernescu cu laureaţii premiului Nobel ai secolului al XX-lea. O carte interesantă. Am vrut să văd şi eu dacă printre aceşti importanţi laureaţi ai sec. XX, în spatele cărora ştim că au existat totdeauna un număr de oameni de ştiinţă care meritau în egală măsură să primească premiul Nobel, cu cine se poate compara Prof. Simionescu? Am putut observa că nu se poate compara cu nimeni. Nu e nicio exagerare în această afirmaţie. Este afirmaţia mea, că el este deasupra tuturor prin modul în care s-a format, prin modul în care a fost dăruit biologic şi prin modul cum a gândit cercetarea ştiinţifică nu numai în România, ci în lumea întreagă. Încât, în această perspectivă, intervenţia mea pare minoră, deoarece se ştie foarte bine pe mapamond cine este Prof. Nicolae Simionescu.

Şi mă gândesc că ceea ce trebuie să reţinem noi este spiritul în care el a lucrat, calitatea spiritului aşa cum o concepea Goethe, care spunea că "o calitate a spiritului este tocmai aceea de a stimula veşnic spiritul". El este unul dintre puţinii oameni de la noi şi din lume, care cred că se poate plasa aici. El nu ne va lăsa niciodată să fim liberi; nu ne va lasa niciodată să lucrăm independent, referindu-mă la rigoarea ştiinţifică, la calitatea umană şi la responsabilitatea umană. Aflat, adesea, într-un loc sau altul de pe Terra (acest lucru nu cred că a avut prea mare importanţă), Prof. Simionescu s-a simţit întotdeauna bine pe teritoriul românesc.

Şi acum, câteva din întâlnirile mele cu Prof. Nae Simionescu (îmi permit să nu spun Nicolae Simionescu, pentru că acest nume a devenit atât de obişnuit, încât sensul lui nu este deloc peiorativ). Poate şi aceasta a făcut parte din elementele, care ne-au apropiat, până acolo încât, n-o să credeţi, chiar şi în perioada studenţiei aproape ne provoca să-i spunem aşa, fiind evident că n-o puteam face… Însă întâlnirea cu adevărat importantă cu Prof. Simionescu s-a produs, pentru mine, în cercetarea ştiinţifică. Am urmărit de-a lungul timpului ce a făcut în domeniul vascular, domeniu de care mă ocup şi eu. Eram aşa de încântat de ceea ce observam în articolele apărute sub semnătura Prof. Nicolae Simionescu şi Maya Simionescu. Era, dacă vreţi, parte din noi şi o parte

din mine făcându-mă să citesc articolul până la capăt, interesându-mă nu numai conţinutul, ci şi cel care-l scrisese, întrucât ştiam foarte bine despre cine este vorba.

Prima întâlnire cu prof. Simionescu a avut loc în perioada studenţiei (în anii 1958-1964), perioada în care Prof. Simionescu era şef de lucrări la Anatomie; am avut şansa ca seria în care eram eu să-l aibă responsabil de lucrări practice şi, respectiv, de un curs de anatomie. O parte din cei de faţă îşi pot imagina această perioadă, altă parte nu şi-o pot imagina, nefiind familiarizati cu atmosfera din acea vreme. După cele ce vă voi spune, veţi observa că a fost pentru noi, tineri studenţi, necunoscători în multe, o perioadă relevantă din punct de vedere al condiţiei umane.

În primul rând, în sala de disecţii, în timp ce noi lucram cu asistenţii, era un permanent zumzet, erau 10 grupe care lucrau simultan. Noi lucram cu un valoros chirurg, Dr. Oghină, care era mult mai în vârstă decât Prof. Simionescu. În momentul când intra în sală Prof. Simionescu, toată lumea înceta să mai vorbească, era o linişte totală; parcă-l văd şi acuma, înalt, brunet, cu halat alb, şorţ alb în faţă, căci aşa se purta atunci. Un bărbat frumos! Îl apreciam, în egală măsură, cu toţii, pentru că impunea prestanţă, dar nu în sensul în care s-ar putea presupune - în relaţia profesor-student - ci în sensul distanţei faţă de un om, la care, credeam noi, că niciodată nu vom putea să accedem, nici măcar cu un cuvânt. A trecut pe la fiecare grupă. A venit şi la grupa noastră. Dr. Oghină s-a ridicat în picioare şi l-a întrebat ceva. Noi disecam un trunchi cerebral. „Spuneţi-mi şi mie ce observăm dacă facem secţiunea aceasta oblică?" Avea obiceiul, ca în grupele bune să nu ne întrebe de secţiuni frontale, sagitale şi orizontale, ci de secţiuni oblice - mult mai complicate, ca să ne surprindă dacă ştim bine anatomie topografică. Ei bine, am ezitat toţi. Am dat eu un răspuns; mi-a răspuns cu un zâmbet care însemna că e bine. Dr. Oghină mi-a spus că a fost foarte bine.

Dr. Oghină ne povestea că era, după părerea lui, cel mai important anatomist pe care l-a cunoscut de la Prof. Rainer şi Gr.T. Popa. Cursurile pe care le-am audiat au fost fascinante. El venea la cursuri fără hârtii, fără notiţe şi rareori folosea nişte planşe. Se excela pe vremea aceea prin planşe. Avea nişte cursuri de o claritate de cristal. Era o transmitere de noţiuni care nu aduceau niciun cuvânt în plus.

Dar, ceea ce ne impresiona pe noi, era plasticitatea exprimării şi mai ales plasticitatea exprimării în grafică, în desen, a ceea ce voia să spună despre nişte structuri foarte complicate. El o făcea în 2-3 scheme, toate într-un concept bine cunoscut al morfologiei funcţionale aşa cum o concepea Prof. Rainer, căruia, din acest punct de vedere şi din altele, i-a fost în continuare

credincios. Morfologia şi anatomia este ştiinţa formei vii. El explica totul fără emfază, cu distanţare, cu o siguranţă, o precizie şi o convingere, faţă de care noi nu aveam replică evident, dar mai erau şi alţii care puteau să aibă eventual o replică (mai erau desigur şi alţi Profesori în Facultatea de Medicină). Acest element făcea ca la sfârşitul cursului noi să fim entuziaşti, într-adevăr, uneori aplaudam, alteori nu, pentru că, adesea, după terminarea cursului noi ieşeam afară în pauză şi ne apropiam de dânsul şi stătea de vorbă cu noi ori de câte ori era posibil.

Cursul pe care-l preda nu se observa că era pregătit dinainte. Bineînţeles că era pregătit, dar noi nu vedeam acea pregătire. Venea parcă la o discuţie între colegi. De altfel, distanţa dintre catedră şi noi, deşi ni se părea aşa de mare din punctul nostru de vedere, el cred că nu o vedea, el era printre noi, încerca să ne transmită toate convingerile sale. Calitatea aceasta a cursului era extraordinară.

Tot în această perioadă din facultate am participat, fără să vreau, la un eveniment trist şi semnificativ în acelaşi timp, din viaţa Prof. Simionescu. Eram în biroul organizaţiei de tineret (responsabil profesional), ceilalţi erau membri de partid, eu nu eram încă. Am fost chemaţi la partid într-o zi, ni s-a pus un text în faţă, de către secretarul nostru de organizaţie, Savelciuc, spunându-ne că trebuie să semnăm acest material pentru că aşa a zis tovarăşul secretar de partid. Tovarăşul secretar de partid era tot anatomist, unul din concurenţii Prof. N. Simionescu la postul de conferenţiar. Nu-i dau numele, el are un nume, dar de fapt este fără nume, chiar dacă acum se află în Germania… Acest text trebuia să-l semnăm şi noi studenţii, ca un argument de susţinere a secretarului de partid împotriva Prof. Simionescu.

Ceilalţi din birou au semnat în mod automat, eram nişte copii, vă puteţi imagina. Să nu credeţi că eu am fost mai isteţ, dar ceva mi se părea că este în neregulă. Cer permisiunea să citesc materialul înainte de a-l semna, evident voiam şi eu să-l semnez, nu puteam să ies din “front”. Când am citit textul, pot să spun că m-am îngrozit , erau nedreptăţi crase, din care rezulta că Prof. Simionescu este “cosmopolit”. Cei mai tineri de astăzi nu-şi pot da seama ce rezonanţă avea termenul acesta în anii aceia. Însemna a fi vândut occidentului. Şi argumentele pentru aceasta erau în principal două. Două erau lucrurile acuzatoare: unul mai puţin important, că vine la cursuri cu pantaloni strâmţi (era o modă atunci şi dânsul, aşa era, venea impecabil îmbrăcat, cu o ţinută superbă şi asta impunea de la început), iar a doua observaţie, care îl încadra, în ceea ce se chema “opoziţie”, că în toate cursurile pe care le prezenta în faţa noastră se menţionau numai autori occidentali. Lucru absolut inexact. Eu observasem ceva, dar nu mi-am dat seama până atunci. Prezenta cursul

din ziua respectivă, dar întotdeauna pe tablă, în dreapta punea autorii occidentali, iar în stânga scria conştiincios autori sovietici. O dată, mi-aduc aminte, cred că nu greşesc, l-a scris chiar cu litere chirilice pe unul dintre ei. De ce a făcut aşa, nu ştiu. Faptul acesta l-am mai verificat controlând cursurile mele ulterior, era un fapt real, deci dădea totdeauna şi autori ruşi şi autori occidentali, aproape la fiecare curs.

Mărturisesc că l-am bănuit că o face cu ostentaţie (să nu credeţi că eram un vizionar), era prea evident că în dreapta erau unii şi în stânga erau ceilalţi... Dar acum, când am văzut acest material, m-a revoltat chestia aceasta, şi i-am spus secretarului de partid că nu este adevărat, "vă arăt cursurile mele". „Dacă dumneata nu vrei să semnezi, nu semna şi poţi să pleci". Nu vreau să vă mai reţin atenţia şi să mai spun ce a urmat după aceasta pentru mine. N-am semnat şi chiar după aceea, concursul a avut loc, nu ştiu exact cum s-a desfăşurat. Secretarul de partid a ajuns undeva pe la stomatologie, conferenţiar, fapt este că la examenul pe care l-a dat seria noastră, a fost o tensiune extraordinară, din cei 7 care eram în birou, 5 au „picat", cum se spune (examenul se dădea cu Prof. Riga, Prof. Repciug şi cu dânsul proba practică, erau probe de dimineaţă până seara). Unul a luat 5, iar eu nu ştiu cum s-a întâmplat, eram mai la urmă, am leşinat pur şi simplu. Şi m-am trezit în faţa dânsului. "Ce-i cu tine, Popa? Ce s-a întâmplat? Ai scris ceva acolo?" A citit cu atenţie 2 minute, cred că nu mai mult, şi după aceea mi-a dat drumul şi mi-a spus să mă odihnesc. Mi-a dat nota 10. Nici acum nu ştiu dacă această notă de 10 mi-a dat-o pentru că leşinasem, sau mi-a dat această notă pentru că probabil auzise ceea ce făcusem eu, într-o notă discordantă (fară a mă lăuda pentru că nu eram conştient de ce fac la momentul acela; eram totuşi singurul din acel birou care am îndrăznit să nu semnez un document care era împotriva lui pentru nişte lucruri neadevărate). După ce s-a întors din America, i-am povestit acest episod, s-a amuzat puțin, "cred că l-am şi uitat", mi-a zis dânsul.

O altă întâlnire din vremea aceea, a avut loc pe bulevard. Eram pe la Casa Armatei. M-a invitat să bem un suc (pe vremea aceea se servea suc cu sifon pe bulevard) şi de acolo până la facultate am parcurs drumul împreună. Aşa de fascinantă a fost discuţia cu dânsul, aveam senzaţia că discutam cu un frate mai mare, care are grijă de mine şi care se preocupa de mine fară să fie neapărat deasupra mea sau înaintea mea în demersurile sale. La facultate, mi-a spus un singur lucru: "Ai grijă, tu te comporţi cam riscant…". Poate era o aluzie la ceea ce se întâmplase anterior.

După ce s-a întors din America, m-a rugat să-l văd (eu ocupându-mă de neurologie) pe Prof. Taşcă, un cunoscut al lui, apropiat al lui, care a

făcut un accident vascular. Şi l-am vizitat. După ce am discutat împreună, într-o fracţiune de secundă amândoi am ajuns în acelaşi loc, la aceeaşi concluzie. Şi, la sfârşit, în birou la mine i-am spus părerea mea şi mi-a spus că înţelege, ştie ce va urma. Şi într-adevăr aşa a fost, cum a presupus dânsul. Este mare diferenţă spunea, între ceea ce putem obţine pe animale şi ceea ce se întamplă la om. Totuşi, pentru o parte din procesele care se întâmplă la om, studiul experimental pe animale, odată şi odată va putea să rezolve şi aceste probleme. Era vorba de o ocluzie de carotidă, era vorba de procesul de aterogeneză, de toată discuţia cu privire la endoteliu ş.a.m.d. pe care am purtat-o o oră şi ceva la mine în cabinet. Într-un colţ aveam o carte a dânsului de anatomie. “Ce mai ziceţi, domnule Profesor de cartea aceasta”? “Ei, asta nu mă mai interesează acum”, era o carte de anatomie pentru disecţie.

Încă un moment, care spune câte ceva despre această imensă personalitate umană a Prof. N. Simionescu. Făceam atunci un fel de învăţământ “teribil” de partid, pentru cei care erau cadre de conducere. Cum bine ştiţi mai toţi de aici, veneau pentru această formă de învăţământ, o categorie de oameni cu pregătire superioară: filozofi, unii membri ai Academiei. Dânsul participa ca director de institut, eu eram tânăr prorector ştiinţific pentru o perioadă scurtă de timp. Eu am intrat în discuţie cu freudismul şi neofreudismul şi cu asta am încurcat lucrurile pentru că doar un singur Profesor din sală ştia câte ceva despre asta, ceilalţi habar nu aveau. Dânsul venise cu diapozitive şi a cerut permisiunea să-şi expună punctul de vedere. Toată prezentarea dânsului se referea la Institut, la ce s-a realizat în Ţara Românească, mai ales la lucrările făcute cu Palade, într-o prezentare pe înţelesul tuturor acelora care nu aveau de-a face cu medicina. Niciodată nu l-am auzit vorbind într-un mod echivoc, într-un cadru în care, de multe ori, erai obligat să vorbeşti într-un anumit fel. Acesta era Prof. Nicolae Simionescu, cel care a reuşit să depăşească vremurile, a reuşit să se ridice deasupra existenţelor şi să facă ceea ce avea înlăuntrul lui de făcut, cu ambiţia, cu tenacitatea şi mai ales cu un creier extraordinar, pe care îl consider unic.

Rugându-mă să-i examinez nişte rude din familie din Bucureşti, din zona Tei, am văzut atâta comprehensiune şi atâta camaraderie, aş putea spune, în mulţumirile sale pentru ceea ce am putut şi eu să fac la momentul respectiv. Nu s-a îndoit nicio clipă că ar mai fi nevoie de cineva care să-i vadă, deşi erau nişte probleme de mare dificultate; din partea rudelor am văzut un fel de sublimare sentimentală extraordinară, în adoraţie şi mulţumiri pentru că cel care de acolo de sus (aşa îl vedeau dânşii pe Prof. Simionescu, şi aşa îl vedeam şi eu), s-a gândit să le vină

în ajutor. Toate aceste lucruri le făcea cu delicateţe şi o apropiere, încât devenea aproape dezarmantă orice intervenţie.

Am asistat împreună aici la o întâlnire cu Prof. Poenaru; impresionantă această întâlnire la care am participat cu foarte multă plăcere şi atunci credeam că acele momente nu se vor sfârşi niciodată. Încercând să contribuie la o destindere în timpul unei prezentări cu rigori ştiinţifice, la un moment dat Prof. Poenaru trece rapid din limba română în engleză, franceză, germană şi rusă, revenind apoi în limba română. Răspunzându-i colegial, parcă pentru a împrăştia un eventual „echivoc", Prof. Simionescu i-a răspuns în limba japoneză...

Nu credeam că vor veni evenimente care să facă să regretăm că asemenea lucruri nu mai sunt posibile. În acea prezentare, de care o parte va amintiţi, am văzut un fel de gingăşie spirituală implantată într-o sobrietate unică a Profesorului Simionescu, unică zic, şi specială pentru că această sobrietate specială apropie totul de valoare şi depărtează (fără cuvinte) nonvaloarea. Aşa era el, avea un tactism pentru cei care au valoare şi era limpede că cei care n-au valoare n-au ce căuta pe lângă dânsul - fără prea multe cuvinte.

Am fost în Bucureşti când s-a spus că Prof. Nicolae Simionescu a fugit în America şi era în Universitate o discuţie pe tema aceasta. Am fost martorul unor discuţii. Niciodată, chiar şi cei care nu aveau habar de medicina din Universitate, nu l-au contestat pe acest om ca valoare profesională. Desigur, au făcut comentarii că rămâne în America şi nu se mai întoarce. Au regretat foarte mulţi din colegii care l-au cunoscut, mai ales cei de la Institutul Parhon şi nu numai, iar noi, care nu mai eram de mult studenţi, ne-am bucurat, sincer vă spun, pentru că am presupus şi aşa a şi fost, că numai acolo se putea realiza un om de asemenea valoare. Surpriza mare a fost, că şi atunci când s-a întors, o parte l-au aplaudat, iar o parte l-au invidiat. Noi îi simţeam pe aceşti oameni periferici şi simţeam cine este Prof. Nicolae Simionescu. Nu este adevărat că el era concentrat numai aici în Institut, toată lumea ştia cine este Prof. Nicolae Simionescu. E adevărat că dacă cineva l-ar fi lăsat să se desfăşoare, în timpul perioadei cât a fost profesor la Universitate, în domeniul umanistic-cultural, ar fi fost şi mai frumos pentru noi, tinerii de atunci, să vedem şi celelalte faţete pe care dânsul le-a avut şi le-a exprimat într-un mod sau altul.

I.T. Niculescu spunea odată că "a trăi în sufletul şi idealurile elevilor este o formă de nemurire, care înalţă pe om mai mult decât propria sa operă ştiinţifică". Nu ştiu dacă e chiar a lui I.T.Niculescu această formulare, dar mi-a plăcut totdeauna, i se potriveşte Profesorului Nicolae Simionescu. Eu nu pot pretinde a fi elevul său. Am fost un elev al său în

şcoala “primară” şi probabil că acest model m-a ajutat să fac ceva, dacă am făcut ceva. William James spune că “mai uşor se reuşeşte prin exemple, decât prin îndemnuri”. Prof. Simionescu este tipul de om de ştiinţă, tipul de creator, fiinţa umană aproape enciclopedică, sigur enciclopedică, dar dacă ne referim la realizările sale ştiinţifice, ele se concentrează foarte mult, cum era normal, pe domeniul biologiei si patologiei celulare; dar un om, un alt om de ştiinţă de o asemenea complexitate, eu nu cunosc.

Închei cu ceea ce spunea la un moment dat Gabriel Liiceanu într-o lucrare a sa; vorbea de faptul că fiecare om îşi construieşte de-a lungul vieţii un “edificiu afectiv”. “Fiecare om sănătos cu o pregătire mentală normală şi cu o pregătire culturală normală, fiecare om există, continuă să existe, supravieţuieşte, apărându-se prin acest “edificiu afectiv” din care fac parte cei apropiaţi, prietenii, oamenii de ştiinţă, profesorii care sunt în viaţă, care nu sunt în viaţă, oricine altcineva care te sprijină, te ajută să continui să exişti şi să faci ceva. Fără acest edificiu afectiv nu poţi continua, nu poţi exista, nu poţi să faci nimic”.

Sunt fericit să vă spun că Prof. Nicolae Simionescu face parte din edificiul meu afectiv chiar dacă dânsul nu o ştie.

Gh. Benga ,-O dăruire fără margini
(”Academica”, ian. 1996)

Cuvintele nu pot reda îndeajuns ceea ce a reprezentat Acad. Nicolae Simionescu pentru știința românească în general, pentru biologia celulară în particular. Este o pierdere care nu va putea fi compensată niciodată, și pentru cercetarea științifică internațională în care Prof. N. Simionescu se bucura de un loc unic, personalitate recunoscută și unanim apreciată pentru meritele sale, fiind cel mai citat om de știință român.

Activitatea domnului Acad. Nicolae Simionescu în organizarea și conducerea unui Institut de cercetare unic în știința românească, după cum și cea de conducere în Academia Română, ar fi putut să aducă așa de multe contribuții în baza unei formații profesionale și a unei competențe și calități manageriale ieșite din comun.

Tragica dispariție a Acad. N. Simionescu a survenit în luna în care de obicei ne întâlneam pentru a discuta manifestările anuale științifice ale Societății Naționale de Biologie Celulară, o altă creație deosebită a Acad. N. Simionescu, cea mai profesională societate științifică din România, pe care domnia sa a condus-o cu o competență și dăruire fără margini.

Ștefan Șandor ,-Mereu viu, printre noi
(”Academica”, ian. 1996)

Refuz să mă gândesc la prof. Nicolae Simionescu ca la cineva care a dispărut. Există oameni care nu pot dispărea. Ei trăiesc în continuare, au viață fără de moarte prin felul lor de a fi, prin trăsăturile morale, spirituale care-i caracterizează, prin bilanțul vieții lor, prin tot ceea ce au înfăptuit. Profesorul Nicolae Simionescu face parte din această categorie de oameni. De ce pot afirma acest lucru cu toată convingerea?

Mă gândesc în primul rând la Nicolae Simionescu omul. Omul căruia îi lipsește total aroganța, aerul de superioritate caracteristic multora din cei care ajung la funcții și situații profesionale deosebite. Omul apropiat de oameni, de colaboratori, de toți cei cu care vine în contact. Omul mereu nemulțumit, cu veșnica tendință spre mai bine. Omul care radiază multă, reconfortantă căldură în ochi, pe față, în vorbe, în atitudini. Omul cu simțul umorului. Vreau să spun aici că prietenia noastră a fost și rămâne una din laturile luminoase ale vieții mele, cu care mă mândresc!

Mă gândesc apoi la Nicolae Simionescu dascălul. Iată un singur exemplu semnificativ: studenții lui de la Yale University l-au propus pentru premiul acordat celui mai bun Profesor al Facultății de Medicină! De altfel, pe lângă prelegeri de biologie celulară la Yale și Columbia University și la alte universități din țară și străinătate, a ținut cursuri fiind invitat la 33 de instituții de învățământ superior din diferite țări.

Gândindu-mă la Nicolae Simionescu omul de știință, nu insist asupra numărului lucrărilor publicate (număr pe care, în ”Curriculum vitae”, dânsul îl considera – nota bene – „valoric nesemnificativ”), ci la alte date ale ”statisticii” lui personale: vorbitor la 25 congrese și simpozioane, responsabilități organizatorice la 17 întruniri internaționale, membru în 5 colegii editoriale și în 13 societăți științifice internaționale; redactor și autor de tratate și monografii, autor de capitole din volume prestigioase, fundamentale în domeniu.

Ca cercetător, îl caracterizează căutarea pasionată a noului,

aprofundarea celor cunoscute, descoperirile lui intrând în patrimoniul de bază al biologiei celulare; imaginație și curiozitate în munca proprie. Pregătirea lui largă, multilaterală în diverse domenii medico-biologice, se asociază în mod impresionant cu respectul și recunoștința față de maeștrii cărora li se simte îndatorat.

Și...nu în ultimul rând, mă gândesc la Nicolae Simionescu cetățean al acestei țări. Spre deosebire de mulți alții, care înțeleg să-și afirme doar prin vorbe trimise din depărtare apartenența lor față de patrie, el a revenit în țară dintr-o situație socială și profesională consolidată în străinătate. A demonstrat concret înțelegerea faptului că adevăratul patriotism înseamnă a face, a crea ceva pentru această țară mult năpăstuită. Ceea ce a și făcut. A creat Institutul de Biologie și Patologie Celulară precum și prima școală autonomă de biologie celulară, care și-au ocupat locul binemeritat în primele rânduri ale domeniului.

În multiple funcții de mare răspundere, s-a străduit de-a înnoi viața științifică, organizarea științei din țară, luptând împotriva rutinei, a vechilor deprinderi, pentru modernizarea cadrului de dezvoltare a cercetării științifice. Iată de ce, Profesorul Nicolae Simionescu rămâne pentru mine, pentru noi toți, mereu viu. Este și va fi mereu printre noi!

Radu Deac ,-Un creator de instituții
(”Academica”, ian. 1996)

De ce simțim așa de acut dispariția Prof. Nicolae Simionescu? În primul rând pentru modelul de om profesionist, de intelectual. Să nu mai amintim de personalitatea și farmecul lui. Pentru eroismul de a se întoarce pe aceste meleaguri dintr-o țară în care avea aproape tot ce și-ar fi dorit cineva și care i-a recunoscut valoarea din plin. În primul rând pentru modelul de om profesionist, de intelectual. Să nu mai amintim de personalitatea și farmecul lui. Pentru verticalitatea omului care a îndrăznit, în vremuri în care nici unul dintre noi nu îndrăznea, să spună acele adevăruri. Pentru că Prof. Simionescu ne-a învățat să prețuim valoarea în știință, în artă sau în literatură și nu în ultimul rând, pentru faptul că ne-a deschis calea către un nou tip de cercetare, nou pentru această țară, dar mai ales nou prin ea însăși, pentru că distila o viață de om, de morfolog, de fiziolog, de chirurg.

A creat deci un model, o instituție, o școală, și pentru că toate acestea trebuiau să poarte un nume, i s-a spus Institutul de Biologie și Patologie Celulară ”Nicolae Simionescu”. Această instituție va dăinui peste veacuri, amintind de ctitorul ei, de acea „lumină” care a fost la începutul acestei mărețe întreprinderi.

Andrei Sulica

Acad. Nicolae Simionescu – promotorul reformei cercetării științifice.

Introducerea Sistemului de Granturi competitive pentru prima oară în România – în Academia Română.

(”Academica”, ian. 1996)

În 1994, la Adunarea generală a Academiei Române, Acad.Nicolae Simionescu a prezentat raportul intitulat ”Măsuri pentru îmbunătățirea cercetării științifice în Academia Română”, din care mi se pare oportun să citez câteva fragmente:

”(1) Este notoriu că Știința contemporană avansează într-un ritm extrem de alert, la care toate comunitățile științifice fac un deosebit efort de a se racorda.

Chiar dacă cercetarea științifică în Academia Română ar merge excelent, totuși prin natura și scopurile ei în permanentă adaptare, activitatea de cercetare se cere în continuare ameliorată.

(2) Dacă nu facem un efort să modernizăm și să revitalizăm cercetarea științifică în Academia Română, fără voia noastră vom fi părtași la pericolul grav al perpetuării și adâncirii decalajelor tehnologice și de competivitate ale României și, prin asta, la pierderea identității patrimoniului intelectual românesc în cadrul comunității științifice internaționale.

(3) Desigur, suntem conștienți că România trece printr-o profundă criză economico-socială, dar în cadrul ei cea mai gravă este criza științei și culturii și incertitudinea supraviețuirii școlilor și centrelor de excelență. De aceea, este esențială luarea urgentă de decizii politice care să ateste concret că, chiar și într-o perioadă de declin economic, sprijinirea cercetării fundamentale este o datorie morală a Statului”.

În cele ce urmează, voi prezenta succint crearea sistemului de finanțare competitivă a cercetării științifice prin granturile Academiei Române (GAR).

Introducerea unui astfel de mecanism responsabil și imparțial, prin care

și așa puținele fonduri bugetare puse la dispoziția cercetării urmau să fie alocate printr-o competiție arbitrată de specialiști de valoare și cu deosebită onestitate constituia ”cheia de boltă” a reformei științei românești.

Această ”concurență” creează nu numai posibilitatea de a departaja cercetătorii performanți pe plan internațional de majoritatea celorlalți ce pot fi considerați, în cel mai bun caz, drept mediocri, dar și schițarea unei piramide valorice reale, în al cărei vârf urmau să fie plasate elementele cele mai reprezentative ale științei contemporane românești, acceptate și de comunitatea științifică din străinătate.

Fiind onorat de încrederea care mi-a fost oferită de Prof. Nicolae Simionescu, am avut privilegiul de a participa și contribui atât la măsurile premergătoare creării Consiliului pentru Granturile Academiei Române (GAR), cât și la cele legate de stabilirea cadrului organizatoric și funcțional al acestui organism.

Primele elemente concrete ale acestei acțiuni prin care s-a făcut un fel de ”tatonare a pieții” au avut loc în 1993 și 1994, când Prof. Nicolae Simionescu, în calitate de președinte al Comisiei de Biotehnologie a Colegiului Consultativ, a decis ca întreaga cotă din Fondul special de cercetare-dezvoltare ce revenea acestui domeniu de cercetare, să fie scoasă la concurs deschis tuturor celor care candidau la realizarea unor proiecte de cercetare. Aceste două competiții, pentru finanțarea prin granturi, au constituit un succes deosebit prin numărul mare al solicitanților din foarte variate domenii ale biotehnologiei, prin calitatea deosebită a unor proiecte de cercetare, ca și prin mecanismele de evaluare la care au participat în mod benevol cei mai reprezentativi specialiști din întreaga țară.

La începutul anului 1994, Prof. Nicolae Simionescu, împreună cu un grup restrâns de specialiști, printre care figurau Dl. Gh. Zaman, Dna. Steliana Sandu și Dl. S. Beldescu, au creionat un scenariu pe a cărui bază urma să se realizeze în mod etapizat, fundamentul acțiunii de elaborare a mecanismelor pentru acordarea GAR. În această inițială perioadă, Acad. Nicolae Simionescu a avut fructuoase discuții și cu domnii T. Eisemon și G. Tillman, reprezentanți ai Băncii Mondiale, reușind să le schimbe punctele de vedere în sensul includerii și a institutelor de cercetare ale Academiei Române, pe lângă unitățile de cercetare ale învățământului universitar, în prezentul proiect de finanțare competitivă substanțială a științei românești.

Primele materiale elaborate de Acad. Nicolae Simionescu și de colaboratorii săi, adică componența Consiliului GAR și Regulamentul de organizare și funcționare a sistemului de finanțare competitivă, au fost elaborate și aprobate de Prezidiul Academiei Române la sfârșitul lunii noiembrie 1994.

Sistemul de granturi competitive se bazează pe mecanismul de evaluare proiectelor de cercetare propuse pentru finanțare, mecanism definit sub denumirea de ”peer review” realizat în comisii de evaluare (cunoscute și sub denumirea de ”study section”), în care sunt incluși specialiști recunoscuți atât prin valoarea lor profesională, cât și prin imparțialitate, probitate și confidențialitate. Din definirea acestui tip de evaluare drept ”peer review”, rezultă obligativitatea ca evaluatorii să fie cel puțin egali din punct de vedere profesional cu valoarea solicitanților, astfel încât aceștia să-i poată accepta în postura de ”arbitri” ce selectează drept câștigători numai acel număr limitat de proiecte de cercetare detașate valoric în raport cu majoritatea celorlalte propuneri de finanțare.

Crearea sistemului de finanțare competitivă de către Acad. Nicolae Simionescu constituie un mare succes în lumea științifică românească. Concludent în acest sens se plasează în primul rând rezultatele competițiilor pentru GAR, care au avut loc în 1995 și 1996. Sunt remarcabile atât ecoul și aprecierile extrem de favorabile ale majorității cercetătorilor, cât și creșterile cantitative și calitative ale solicitărilor pentru GAR-uri în 1996 (416 propuneri primite) în raport cu 1995 (274 propuneri).

În al doilea rând, nu numai generalizarea pe plan național al acestui sistem de finanțare competitivă, preluat și de Ministerul Cercetării și Tehnologiei, ca și de Ministerul Învățământului, ci și oficializarea și consfințirea sa la nivel guvernamental (prin includerea sa în Ordonanța nr. 25 din 1995), constituie recunoașterea absolută a rolului fundamental pe care îl are mecanismul concurenței bazat pe alocarea prin granturi a fondurilor pentru cercetare, mecanism ce exprimă începutul reformei reale a cercetării științifice românești, inițiat și concretizat aproape în totalitate de către Acad. Nicolae Simionescu.

Nicolae SIMIONESCU

Poeme

POEME

de Nicolae Simionescu

(Selecție)

Noapte

Jos
Pe-o pânză ireală
de cerneală
Adunaţi în grupuri mici
Sute-ntregi de licurici
Încercau pe a lor speze
Cu-orice preţ să eclipseze
Strălucirea-mprumutată
De o lună
Incompletă şi pătată...

Sus,
sub cer,
Numai liniştea din gând
Îngâna încetinita
Undă-a sângelui curgând.

Septembrie, 1960, Noaptea pe varful Pietrei Craiului

Dimineața

Ireală dimineaţă
La hotar de vis şi viaţă

Încă n-apucase toată
ziua să răzbată
Și-i priveam stingher
Intrarea-n lume, de sub cer...

Pe câmpia cu-atâta verde, cadrilată
Cu carpete de ogoare
Cerul scămoşi-se vată
Și fâşii de soare.

Ici şi colo presărate
Cuburi mici de lemn şi viaţă
Par minuni adevărate...
Ireală dimineaţă...

Septembrie, 1960, Dimineata pe vârful Pietrei Craiului

Am ieșit din mine

Am ieşit din mine
Și m-am aşezat alături
Pe iarba tăvălită de gânduri...

Mă dezbrăcasem de simţuri
Ca de nişte pături calde
În care n-au apucat să se scalde
Decât vârfurile degetelor
Ale degetelor
Pe care şi când zăbovesc
şi când umblă le-ascult

Dar n-am stat nici aici prea mult...
Și iar am ieşit şi m-am asezat
Lângă mine...
Și tot aşa de multe mii de ori
m-am dedublat
şi desfăcut
Și unii din mine au ajuns pe praf
Alţii pe apă,
Alţii pe flori,
Întinzându-mă cu infinitul spre apus
Din ce în ce mai departe de sus...

Apoi,
l-am ciocănit pe fiecare
şi l-am scuturat
Pregăteam o reîncarnare
cu aluat, înecat

în pâine şi sare
în fum, petale şi soare-afumat.

Priveam de-aproape pe fiecare
desprins
cu-atâta asemănare
Și m-a cuprins
o disperare sumbră
Nici unul din ei nu lăsa umbră
Un glas pretindea că-s învins.

Mai 1961

Poate

Poate că dând chip de om
Unui ciot de pom
Voiam doar să pun în loc
Un vreasc din foc...

Nu răsufla deasupra lui
Poate nu-i.
Nu-l strânge
Căci n-afli când plânge

L-a durut
Numai când a fost făcut
Și,
poate o să-l mai doară
Iară,
când n-o mai fi...

Ăsta mic
Nu ştie nimic
Pe-ăla mare
Il doare
Că-i o bucată neterminată

De la ei n-aştepta ceva,
Doar numără-i
Cu mine, sunt trei
Alături de tine

August 1961

Flori frânte

Nu știu cum s-a făcut
Și nici ce-o fi
Dar am început
să rup
Flori vii
care nu mai cresc la loc,
Care vor zâmbi
Poate o zi,
şi poate înc-o zi,
Cât supravieţuiesc
în apa în care le-am pus
Să le-amorţesc
Durerea frânturilor de trup...

20 Noiembrie 1961

Am umblat prin mine

Am umblat prin mine, singur
Necondus şi uitând de toate,
Îmi cătam o cale veche
Ca s-o dau în schimb
pe-un poate
Zăbovii,
Căci înăuntru
Au vrut multe să le-ascult
Când ieşi cu schimbu-afară
Târgul era-nchis demult ...

M-aşezai jos
Lângă mine
Dedublat dar neîmpărţit
Zorii au umezit o frunză
Și-au uscat-o-n asfinţit

Cine-ar vrea
Să mă înveţe
Cine-ar şti
Să mă dezveţe
Că se-ntorc de mii de ori
Frunze,
Asfinţit
şi zori !?

11 Decembrie 1961

Visurile

Visurile sunt jucăriile cele mai gingașe
ale lumii adevărate ...
Cât eşti mic le poţi socoti
printre jocurile tale preferate
Mai târziu să nu le strângi,
Dar nici să nu lupţi cu ele
Că rişti să ţi le-nfrângi
singur ...

Bradul

Purtam pe mine frunzele crescute
sau lipite ale unui brad mare
în parte adevărat, în parte artificial ...

La prima adiere
au căzut frunzele de hârtie
cu care mimam bogăţie ...

Când a bătut, nechemat,
vântul, mi-a furat
Conurile mari ale asprimii
şi micile netede frunze verzi
cu care înţepam razele de soare ...

În furtună
am rămas un trunchi stingher
ca o parte prea scurtă între
pământ şi cer ...

Dar nu-mi cere şi nu aştepta
ca pentru podoabele de iarnă, pentru umbra verii
sau pentru a tremura în vânt
Să-mi înfig vreodată vârful în pământ ...

Am ascuns
în mână
nodul ce leagă cele trecute
de cele ce-or fi ...

Mai bine să nu ştiu şi
nici să nu ştii
cât e de strâns
şi cât o să rămână
de plâns

Fată plânsă
cu mâna aceasta vânătă
de strânsă
Aş putea să te mângâi
vreodată ? ...

Sisteme solare

Fiecare, bun sau rău,
Se roteşte-n jurul său
Într-un scârţâit tăcut sau zgomotos
În sensul desfacerii sau pe dos
Mai agale sau pripit
Încercându-şi echilibrul:
Fața se întoarce spre spate
care-i fuge s-o ajungă
şi tot aşa, de cum a început
Viitorul trece continuu prin trecut ...
Fiecare,
Mai mulţi fiecare
Sau doar unul
Are centrul într-un soare
Luat cu-mprumut
Din galaxia rămasă
la urma lumii
Sisteme solare
singulare
Desenate
în singurătate
Și-n care căldura luminoasă
O dau orbitele-îndepărtate.

27 Martie 1962

Revedere

Mugure,
te-am văzut
cum te-ai născut
ca o chemare
răzbită greu ...

Mugurul meu,
ai crescut
acum eşti ins şi floare ...
De-atâtea ori
am trecut pe lângă tine
crezând că-s numai eu cu mine ...

Acum, aici,
boabele mici
ce-mi cad din ochi
se adună ca un strugure
străveziu,
din care mai târziu
ai să te-mbeţi poate doar tu,
mugure ...

mai 1962

NICOLAE SIMIONESCU -
CURRICULUM VITAE

Data și locul nașterii: 27 Iunie, 1926, București, România

Starea civilă: căsătorit, 2 copii; Naționalitatea: română

FUNCȚII OCUPATE

În țară:

* Profesor și Director al Institutului de Biologie și Patologie Celulară

* Vicepreședinte al Academiei Române

* Președinte, Fundația Română pentru Știință

* Președinte, Comitetul Național pentru Biotehnologie Moleculară

* Președinte, Comisia de Biotehnologie a Colegiului Consultativ pentru Cercetare Aplicativă și Dezvoltare

* Vicepreședinte, Academia de Științe Medicale

* Vicepreședinte, Comisia Superioară de Atestare

* Președinte, Societatea Națională de Biologie Celulară

În străinătate:

* Cercetător principal, Rockefeller University, New York, NY, SUA

* Visiting Professor - Yale University, New Haven, USA

* Visiting Professor - Columbia University, New York, USA

TITLURI ACADEMICE

* Doctor în Științe Medicale, Facultatea de Medicină, București, (1967)

* Membru al Academiei Române (1990)

* Vicepreședinte al Academiei Române (1994)

* Ludwig Schaffer Distinguished Visiting Professor of Columbia University, New York, USA (1991)

* Borun Visiting Professor of Cardiology, UCLA, Los Angeles, CA, USA (1990)

* Visiting Professor of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montreal, Canada (din anul 1978)

STUDII

1994 - Bacalaureat - Liceul Sf. Andrei, București

1950 - Doctor în Medicină - Facultatea de Medicină (Diploma de Merit), București

1966 - Doctor în Științe Medicale - Ministerul Învățământului, România

INSTITUȚII ȘI ACTIVITĂȚI PROFESIONALE

Catedra de Anatomie, Facultatea de Medicină, București

-Începând cu anul 1946, student în anul doi la Facultatea de Medicină din București, la invitația Prof. Gr. T. Popa, devine Preparator la Catedra de Anatomie a Facultății; în anul 1952 este promovat asistent, apoi lector.

-Între anii 1962 - 1970 este Conferențiar, Șef al Departamentului de Anatomie și Fiziologie, Facultatea de Medicină și Farmacie.

-Între anii 1947 - 1949 este Extern și apoi intern la Clinica de Chirurgie condusă de Prof. Ion Juvara, iar între 1950 - 1957 este Secundar - Specialitatea Chirurgie.

-În această perioadă publică 15 monografii, tratate și manuale pentru studenți, ce s-au bucurat, ca de altfel și cursurile sale, de o deosebită apreciere a viitorilor medici.

Institutul de Endocrinologie, București

1957 - 1968 Cercetător Principal

1968 - 1970 Șef al Departamentului de Morfologie

Consiliul Național pentru Știință și Tehnologie, București

1966 - 1968 Consilier, Comisia de Medicină și Biologie

Rockefeller University, New York

1970 - 1973 Cercetător, Departamentul de Biologie Celulară

Yale University -School of Medicine, New Haven

1973 - 1975 Cercetător, Secția de Biologie Celulară

1975 - 1977 Cercetător, Secția de Biologie Celulară; Lector în Citologie

1977 - 1978 Cercetător Senior și Lector Senior, Secția de Biologie Celulară

1978 - 1994 Profesor de Biologie Celulară (Visiting), Dept. de Biologie Celulară

Institutul de Biologie și Patologie Celulară, (IBPC), București

1978 - 1995: Director și Profesor

1979 – 1995: lucrează anual 9 luni la IBPC București și 3 luni ca Visiting Profesor la Universitatea Yale, New Haven, sau la Universitatea Columbia, New York, SUA.

SPECIALIZĂRI ÎN BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ

1968: Bursier al Uniunii Internaționale Contra Cancerului:

-Institute Jules Bordet, Bruxelles, Belgium;

-Institute Gustave Roussy, Paris, France;

-National Institutes of Health, Institute of Pathology, W. Reed Hospital, Bethesda, SUA.

1970 - 1973: Rockefeller University, Dept. Cell Biology (Prof. G.E. Palade), New York, SUA

1973 - 1979: Yale University, Dept. Cell Biology (Prof. G.E. Palade), New Haven, SUA

Maeștrii: Mărturisirea prof. Nicolae Simionescu

"Am avut deosebitul pirivilegiu de a lucra cu unii dintre cei mai remarcabili profesioniști și oameni de știință care mi-au influențat în mod hotărâtor întreaga activitate. Aceștia au fost: Prof. Gr. T. Popa (anatomie), Prof. Ion Juvara (chirurgie), Prof. St. M. Milcu (endocrinologie, cu care am lucrat 18 ani) și Prof. George E. Palade (biologie celulară, cu care am lucrat 10 ani la Universitatea Rockefeller si la Universitatea Yale, SUA, urmați de alți ani de colaborare). Rolul lor în formarea mea este inestimabil".

ACTIVITATE DIDACTICĂ

În România:

1946 - 1970: preparator - asistent - lector - conferențiar, Catedra de Anatomie - Facultatea de Medicină, București;

1991 - 1993: Cursul de Biologie Celulară al Facultății de Medicină și al Facultății de Biologie - Universitatea Constanța;

1982 - 1995: Conducător științific pentru Doctorat în Biologie Celulară și Moleculară.

Universități din străinatate:

1974 -1995: Prelegeri și demonstrații practice la Cursul de Biologie Celulară: Yale University School of Medicine; Conducător științific - teze de doctorat -Yale University.

1973 - 1995: prelegeri de biologie celulară la universitățile :Columbia, New York; Mount Sinai School of Medicine -New York; SUNY Downstate Medical School - Brooklyn; NYU Medical School - New York; University of Massachusetts -Worcester; Harvard University School of Medicine - Boston; UCLA University Medical School - Los Angeles; McGill University Montreal; University of Tokyo School of Medicine - Tokyo; Faculty of Medicine - Kyoto; Faculte Xavier Bichat - Paris; Faculty of Medicine – Lisabona etc.

1978: Propus de studenții în medicină pentru premiul Bohum acordat celui mai bun Profesor al Facultății de Medicină al Universității Yale.

ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ

Publicații: ~ 616 dintre care: 310 publicații în străinatate (articole, lucrări congrese, monografii, capitole în tratate, rezumate) și 306 publicații în țară.

CITĂRI ÎN LITERATURA INTERNAȚIONALĂ

Conform cu “International Citation Index”- Washington, D.C., SUA, Nicolae Simionescu este printre cercetătorii români cei mai citați în literatura științifică internațională (1990).

DESCOPERIRI OMOLOGATE INTERNAȚIONAL

(1) conceptul și termenii de “transcitoză“ și “transcitoză mediată de receptor” (preluat și ca familie de cuvinte în limba engleză științifică);

(2) stadiul inițial al aterosclerozei este caracterizat de acumularea în subendoteliul arterial de lipoproteine modificate și reasamblate (liposomii extracelulari);

(3) demonstrația existenței receptorilor celulari pentru albumină (albumin binding proteins) - în colaborare;

(4) evidențierea microdomeniilor diferențiate biochimic ale membranei celulei endoteliale (în colaborare);

(5) metode noi în biologia celulară - mordansarea cu galoilglucoză, izolarea celulelor endoteliale din inimă, noi trasori ultrastructurali pentru studiul permeabilității, ș.a.

PREMII ȘI DISTINCȚII

- Premiul “Gh. Marinescu” al Academiei Române - 1967

- Medalia Facultății de Medicină din Thessaloniki - 1975

- Medalia Societății de Științe Medicale și a Facultății de Medicină a Universității din Tokyo - 1975

- Pfizer Fellow al Institutului de Cercetări Clinice din Montreal, Canada - 1978

- Premiul “The Louis and Artur Lucian International Award for Research in Circulatory Diseases” - 1978, McGill University, Montreal, Canada (împreună cu Maya Simionescu)

- Medalia Rokitansky a Academiei Internaționale de Patologie, Vienna, Austria - 1986

- Medalia celei de a 900 Aniversări a Universității din Bologna, Italia - 1987.

- Medalia Universității René Descartes, Paris, Franța - 1992

"INVITED SPEAKER"

la peste 100 de Congrese Internaționale; selecție

-International ICLA Symposium on Husbandry of Laboratory Animals, Ireland (1965)

-International Congress on Endocrinology, Mexico City, Mexico (1986)

-International ICLA Symposium on Experimental Animal Models, Jena, Germany (1986)

-New York Academy Symposium on Atherogenesis, Acapulco, Mexico (1975)

-New York Society for Electron Microscopy, New York, 1976

-Annual Meeting of the America Society of Anatomists, Cleveland, OH, (1977)

-Symposium of Aging and Atherosclerosis, Vichy, France (1977)

-Annual Meeting of the American Society for Histochemistry and Cytochem.Keystone, CO (1978)

-International Congress on Inflammation, Bologna, Italy (1978)

-Second International Congress on Cell Biology, West Berlin, Germany (1980)

-New York Academy Symposium on Endothelium, New York, NY (1980)

-International Course on Microcirculation ISERM, Paris (1982)

-International Symposium on Membrane Biogenesis and Recycling, Hakone, Japan (1984)

-Kurashiki Symposium on Patrobiology of the Vessel Wall, Kurashiki, Japan (1984)

-FASEB Meeting Symposium and Pathobiochemistry, West Berlin, Germany (1986)

-International Congress of the Academy of Pathology, Vienna, Austria (1986)

-Second European Congress on Cell Biology, Budapest, Hungary (1986)

-World Congress on Microcirculation, Tokyo, Japan (1987)

-Symposium at the 900th Anniversary of the University of Bologna, Italy (1987)

-Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, Bielefeld, Germany (1989)

-Third European Congress on Cell Biology, Florence, Italy (1990)

-Symposium on Physiologic Mechanisms and Pathologies Involved in Drug Targeting and Imaging, Compiégne, France (1990)

-XXXII-nd International Congress of Physiological Science, Glasgow, Scotland (1993)

-7th Munster International Ateriosclerosis Symposium, Munster, Germany (1993)

RESPONSABILITĂȚI ORGANIZATORICE

la peste 20 de congrese internaționale - selecție

-Chairman of the Program Committee of the VI Symposium of the International Committee on Laboratory Animals (ICLA), Thessaloniki, Greece (1975)

-Chairman, Japan/US Seminar on Hemorheology and Thrombosis, Kobe, Japan (1975)

-Organizer and Chairman of the Symposium on Endothelial Cell Surface at the III International Congress on Cell Biology, Tokyo, Japan (1984)

-Organizer and Chairman, Kurashiki Symposium on Biopathology of Vascular Wall, Kurashiki, Okayama, Japan (1984)

-Member of International Advisory Board, 2nd European Congress on Cell Biology, Budapest, Hungary (1986)

-Organizer and Chairman, Symposium on Transcytosis, Second European Congress on Cell Biology, Budapest, Hungary (1986)

-Chairman, Symposium on Control of Permeability, Uptake of Macromolecules, 4th International Symposium on the Biology of the Vascular Endothelial Cell, the Netherlands (1986)

-Chairman, Symposium on Pathobiochemistry, 17th FEBS Meeting, West Berlin (1986)

-Member of the international Advisory Committee for 4th International Congress of Cell Biology, Montreal, Canada (1988)

-Organizer and Chairman of the American-Romanian Workshop on the Cell Biology and Pathology of the Vessel Wall, Bucharest

(1983,1985,1989)

-Chairman, Symposium on Vessel Wall and Lipids at Jaques Monod Conference on Vessels-Vascular Pathology, Roscoff, France (1988)

-Member on the International Committee for the Organization of the VI International Symposium on the Biology of Vascular Cells, Paris, France (1990)

-Member, Program Committee of the IIIrd European Congress on Cell Biology, Italy (1990)

-Member, Scientific Committee of the Vth International Congress on Cell Biology, Spain (1992)

-Chairman, Symposium on Endothelial Cell at XXXIIth International Congress on Physiology, Glasgow, Scotland (1993)

-Member, Scientific Committee; VIIIth Intl. Symposium on the Biology of Vascular Cells, Heidelberg, Germany (1994)

-Member, Scientific Committee of the IVth European Congress on Cell Biology, Prague (1994)

"Visiting professorship" și "invited lectureship"

la peste 40 universități și institute de cercetări din lume - selecție

-Centre pour l'Élevage et la Sélection des Animaux de Laboratoire (CNRS), Gif-sur-Ivette, France (1965)

-Centre de Sélection des Animaux de Laboratoire, Orleans-La source, France (1996)

-Institute of Radiology – C.E.N, Mol-Donck, Belgium (1967)

-The Netherlands Institute of Cancer, Amsterdam, The Netherlands (1967)

-Institut Jules Bordet, Bruxelles, Belgium (1968)

-Institut Gustav Roussy, Villejuif, France (1968)

-National Institute of Health, Division of Endocrinology and National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA (1968)

-Armed Force Institute of Pathology, Washington DC, USA (1968)

-New York University School of Medicine, Department of Anatomy and

Cell Biology, New York, NY, USA (1974-1979)

-Department of Experimental Medicine Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Sweden (1974)

-Central Institute for Laboratory Animals, Kawasaki, Japan (1975)

-Kyoto University School of Medicine, Department of Anatomy and Histology, Department of Pathology, Kyoto, Japan (1975 and 1984)

-University of Tokyo and Medical Society of Tokyo, Tokyo, Japan (1975)

-The Institute for Medical Science, Meguku-re, Tokyo, Japan (1975)

-Tokyo Univeristy School of Medicine, Department of Anatomym Tokyo, Japan (1975)

-Faculté de Médicine Xavier Bichat, Paris, France (1982)

-Mount Sinai Medical School, Department of Anatomy, New York, USA (1976)

-Academy of Medical Science, Moscow, USSR (1976)

-Institute de la Vie, Vichy, France (1977)

-SUNY Downstate School of Medicine, Department of Anatomy and Cell Biology, Brooklyn, NY, USA (1977)

-The Rockefeller University, Department of Cellular Immunology and Department of Cell Biology, New York, NY, USA (1977)

-Visiting Professor, McGill University, Department of Anatomy and Cell Biology, Montreal, QU, Canada (1978)

-Pfizer Lecturer, Institute for Clinical Research, Montreal QU, Canada (1978)

-Institut de Biochimie de l'Universitate de Lausanne and Institut Suisse de Recherches Experimmentales sur le Cancer, Lausanne, Suisse (1978)

-Visiting Professor of Cell Biology, Yale University School of Medicine, Department of Cell Biology, New Haven, CT. USA (1979)

-University of Massachusetts Medical School, Department of Pathology, Worcester, MA, USA (1982)

-Faculty of Medicine, University of Lisbon, Department of Histology, Lisbon, Portugal (1983)

-Gulbenkian Institute for Science, Deiras, Portugal (1983)

-Medical Research Institute for Kidney Diseases Shigei, Kurashiki,

Okayama, Japan (1984)

-University of Bologna and the Institute for Clinical

-Harvard University School of Medicine and Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA (1989)

-Ludwig Schaefer Visiting Professor, College of Physician and Surgeons of Columbia University, Department of Physiology and Cellular Biophysics, New York, NY, USA (1990 and 1991)

-Borun Visiting Professor of Cardiology, University of California at Los Angeles, Department of Internal Medicine, Division of Cardiology, Los Angeles, CA, USA (1990)

-Laboratoires Guerbet, Aulnay-sous-Bois, France (1992)

CONSULTANT AL UNOR INSTITUȚII ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE

- WHO expert on experimental endocrinology.

- Expert, Thyroid Cancer Group of the International Union Against Cancer (IUAC).

- Consultant, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA (grant applications).

- Consultant, National Science Foundation, Washington, D.C., USA (grant applications).

- Consultant, Department of Experimental Medicine, Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Sweden.

- Consultant, Cardiology Institute of Texas, Houston, TX, USA

- Consultant, Medical Research Council (MRC), London, England (grant applications).

- Consultant, Medical Research Council of Australia, Adelaide, Australia (grant applications).

- Consultant, Medical Research Council of New Zealand, Auckland, New Zealand (grant applications).

MEMBRU ÎN COLEGII EDITORIALE

Thrombosis Research; Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology; Science et Techniques de l'Animal de Laboratoire; Cell Differentiation; Endothelium, Microvascular Researcg, etc...

Membru în societăți științifice internaționale

American Society for Cell Biology; American Thyroid Association; American Association for the Advancement of Science; International Society for Biological Rhythms; International Society for Stereology; International Society for Endocrinology; European Society for Experimental Surgery; European Society for Comparative Endocrinology; Italian Anatomical Society; International Committee on Laboratory Animals; ICLA (Governing Board); European Artery Club (Governing Board); European Vascular Biology Association etc...

Realizări organizatorice profesional-științifice

(1) Înființarea Institutului de Biologie și Patologie Celulară din București, dotarea lui cu materiale (~15 tone = ~450.000 $) și obținerea subvenționării lui de către NIH-SUA în perioada 1980-1989 (împreună cu Maya Simionescu) prin trei granturi competitive în valoare de ~400.000$;

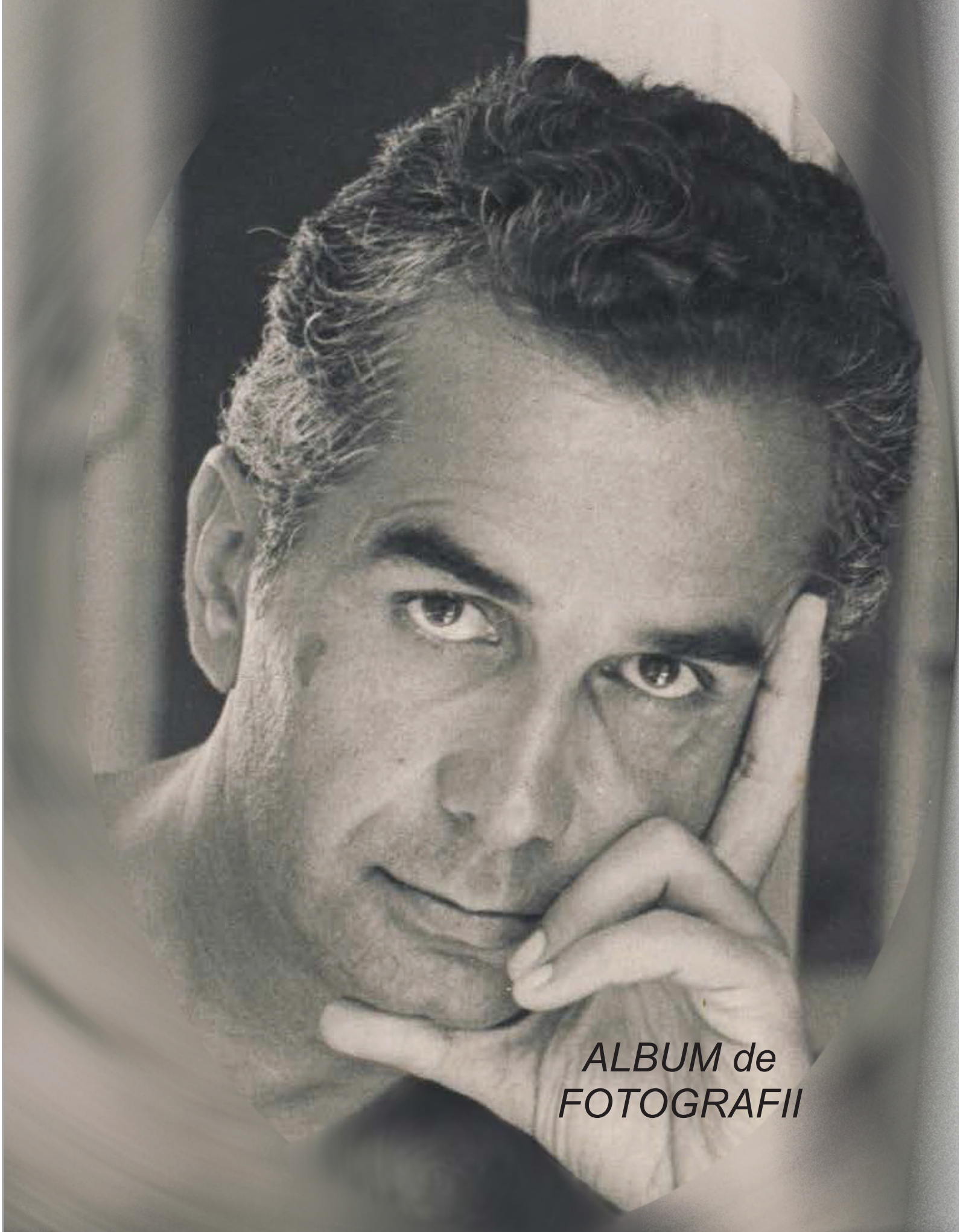
(2) Fondatorul Școlii românești de biologie celulară (împreună cu Maya Simionescu);

(3) Înființarea Societății Naționale de Biologie Celulară;

(4) Înființarea Comitetului Național de Biotehnologie Avansată (Academia Română + Ministerul Cercetării și Tehnologiei);

(5) Introducerea sistemului de granturi competitive pentru proiecte individuale de cercetare în România, în Academia Română.

(6) Organizarea de Laboratoare Metodologice de Biotehnologie Moleculară.


ALBUM de
FOTOGRAFII

FAMILIA SIMIONESCU

Dumitra și Vasile Simionescu, Didi și Oanca (surori) și micul Nicolae

COPILĂRIE

FAMILIA SIMIONESCU

”Tatăl său l-a stimulat fără întrerupere ajutându-l să-şi clădească meritata încredere în propriile forţe…” (Maya Simionescu)

"Simionescu era inteligent, ordonat, desena şi scria foarte frumos şi talentat la voley, basket, fotbal. Cânta în corul liceului, spunea poezii patriotice la serbări…"

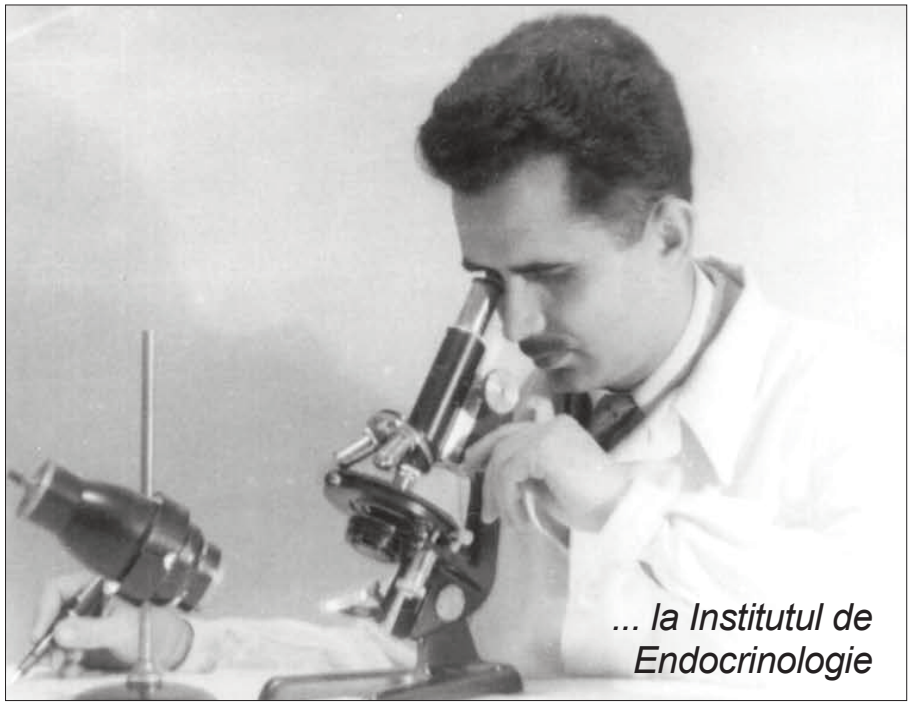
(Paul Georgescu, coleg de școală)

Nicolae Simionescu s-a maturizat și mai mult… recita din Eminescu la toate serbările, ca nimeni altul, se evidenţia la română şi latină… De fapt, el decisese că se va face medic. …"
(fostul coleg de clasă Paul Georgescu)

"În acest tânăr, … am simţit imediat patosul, acea forţă interioară căreia nu-i rezistă nimic. Ce tensiune interioară, ce aspiraţie spre cunoaştere…"
(spune mentorul său, Prof. Ştefan Milcu)

... operând cu Maya

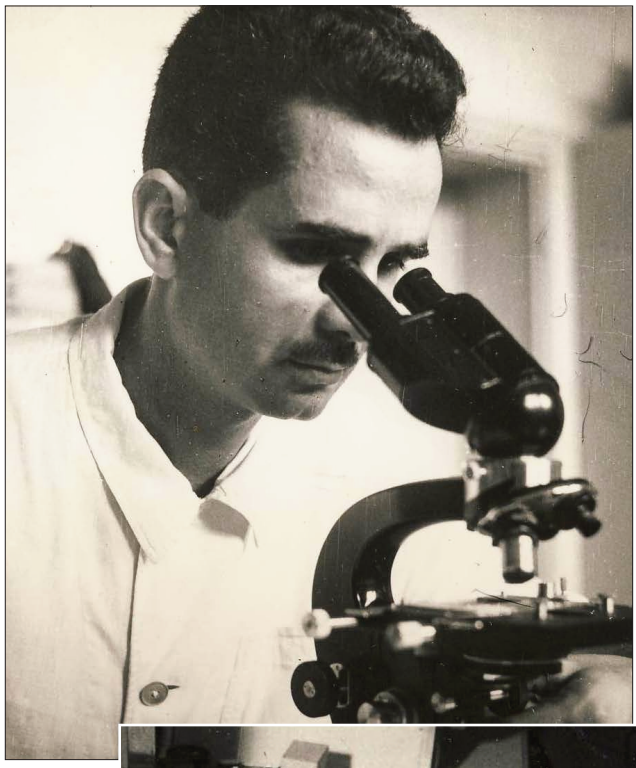
... așa s-a nascut ideea Institutului



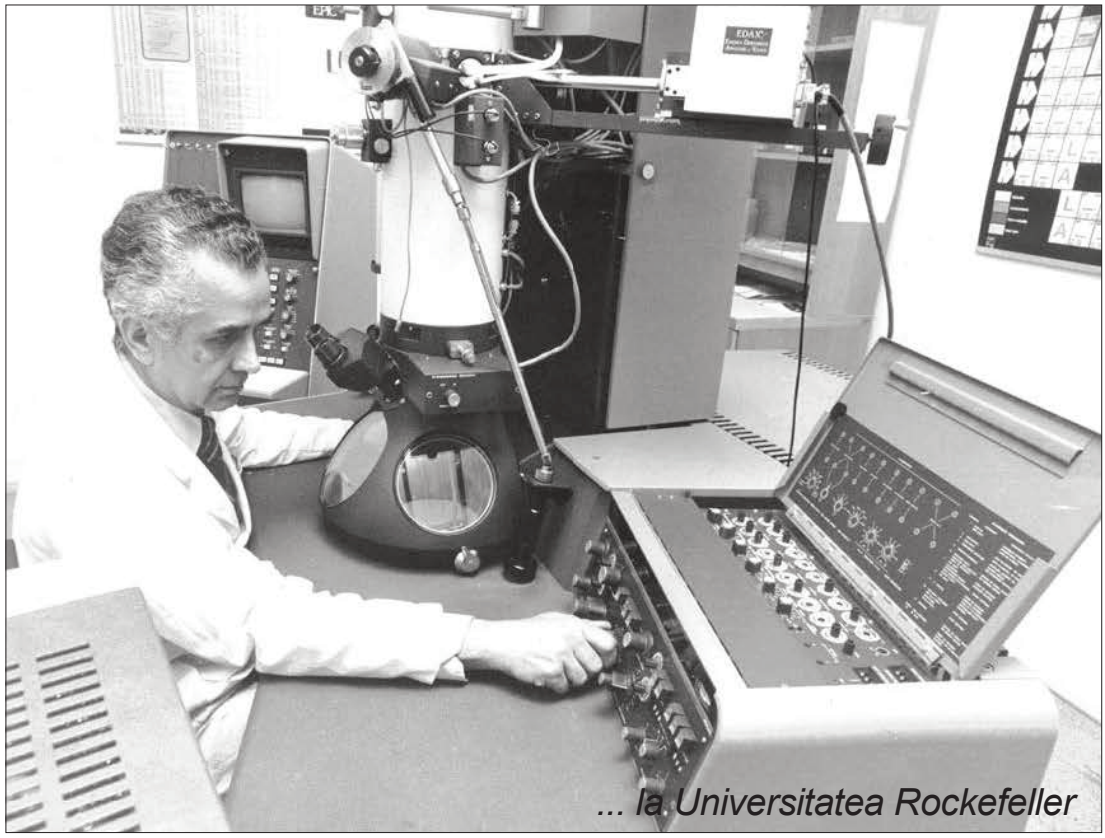
... la Institutul de Endocrinologie

”Ca un adevărat cercetător, n-avea program. Rămânea în laborator până târziu în noapte. Vedea în microscop ce alţii nu vedeau!”

Prof. Ștefan Milcu



... la Institutul de Endocrinologie

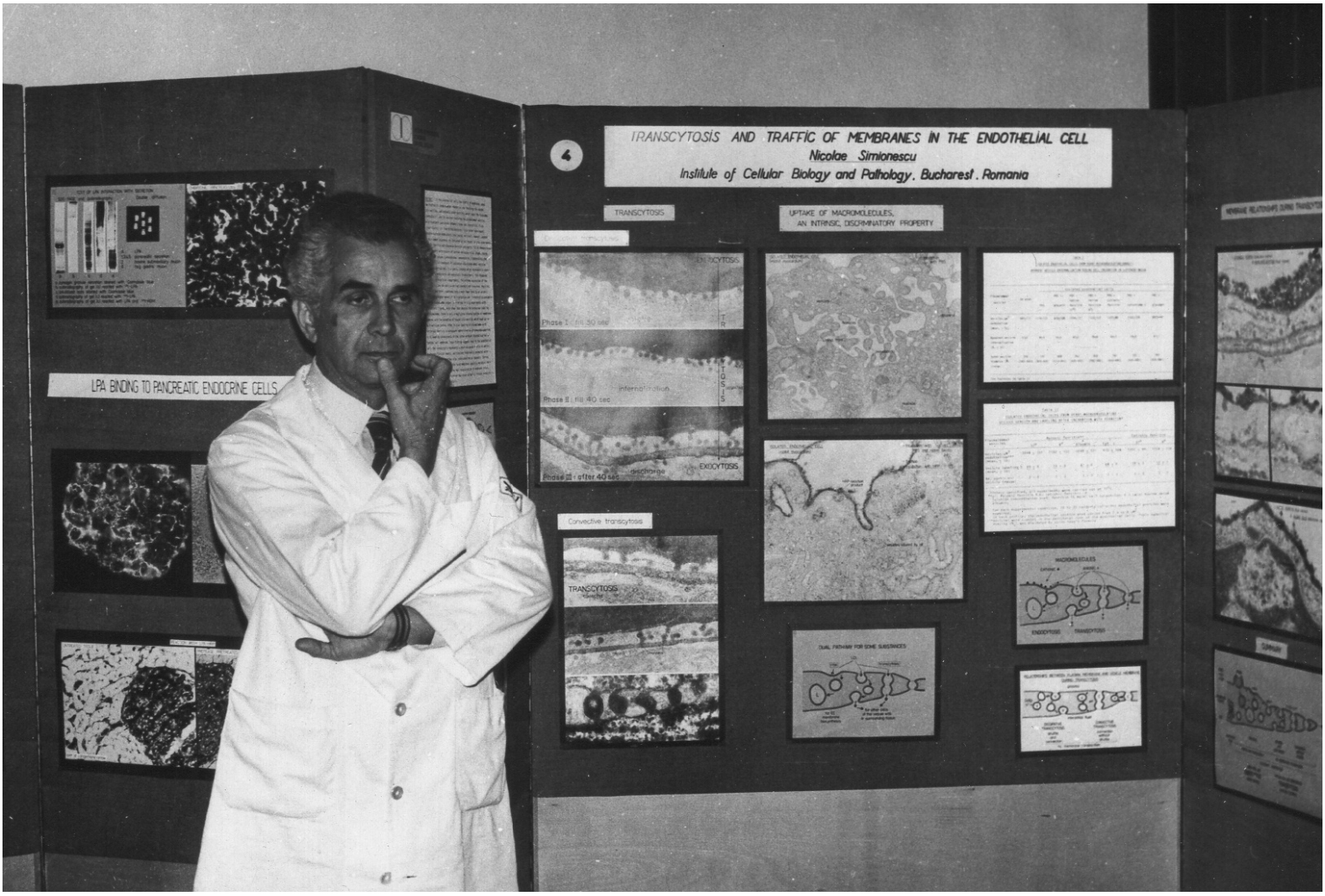


... la Universitatea Rockefeller

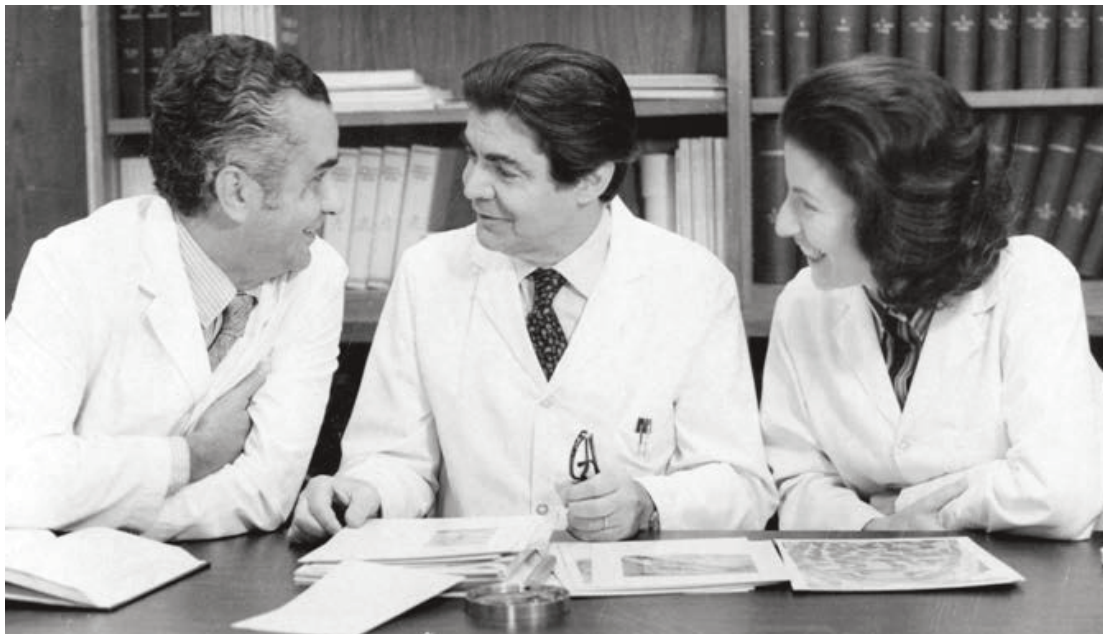
”Nicolae Simionescu a avut o carieră meteorică. În zece ani, pornind cu o inteligenţă sclipitoare şi o educaţie generală valoroasă a devenit o autoritate deplină şi unanim recunoscută în biologia celulară a endoteliului vascular. In decada următoare şi în continuare, în condiţii sociale şi politice nesigure şi dificile, a organizat un institut de cercetare şi a pregătit o întreaga echipă de cercetători capabili, iar în următorii cinci ani şi-a asumat o poziţie de conducere în Academia Română, cea mai înaltă instituţie care ghidează activitatea de creaţie a ţării.

În fiecare etapă în această rapidă evoluţie, a lăsat în urmă o moştenire durabilă: - realizările cercetărilor lui ştiinţifice, - Institutul de Biologie şi Patologie Celulară - două generaţii de cercetători bine pregătiţi - şi o exigentă dar luminoasă viziune asupra viitorului ştiinţelor biologice şi biomedicale în România.”

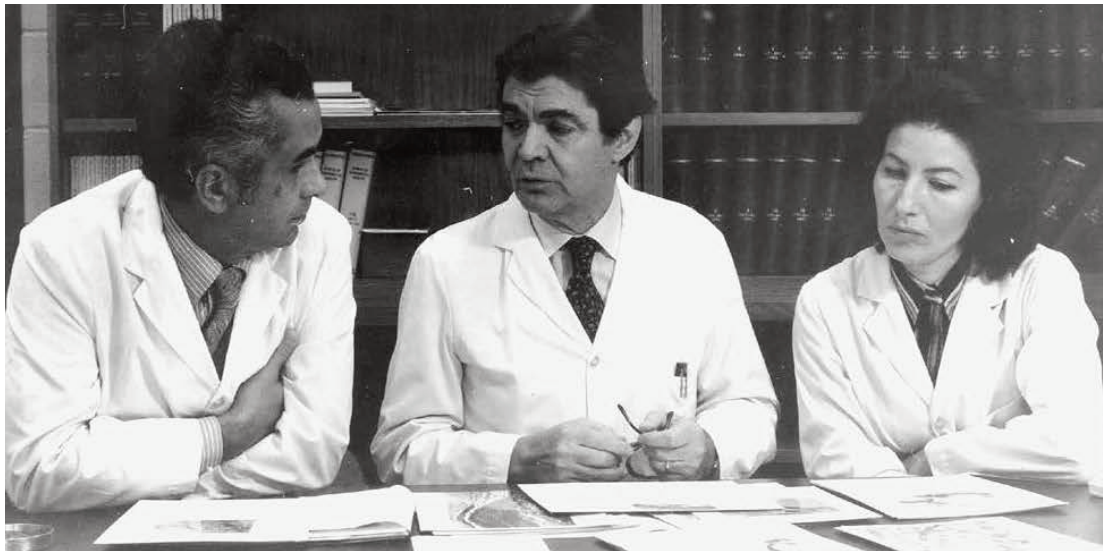
Prof. G. E. Palade



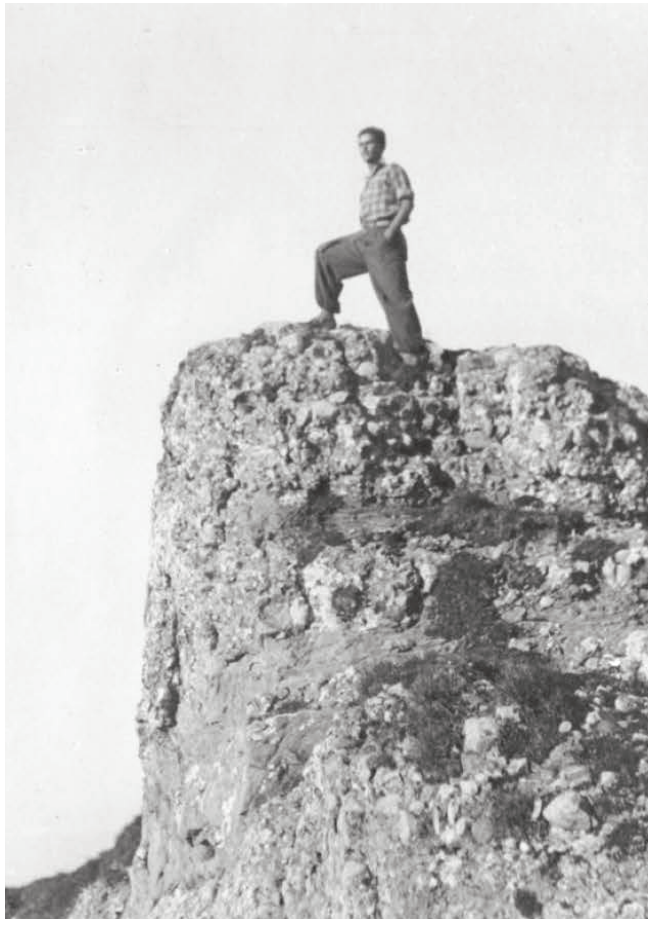
Nicolae Simionescu - și primele ”postere” din România la IBPC



La Universitatea Rockefeller cu Prof. G. Palade și Maya Simionescu



”Cercetarea ştiinţifică este mai mult decât o profesie, este un mod de a trăi, cu strădanii reuşite alături de încercări nereuşite, iar între ele marea agitată a îndoielilor care te invită la înţelepciune. Iar în lupta dintre bucuria succeselor şi amăreala eşecurilor, principalul instrument de conservare rămâne pasiunea.”
Nicolae Simionescu



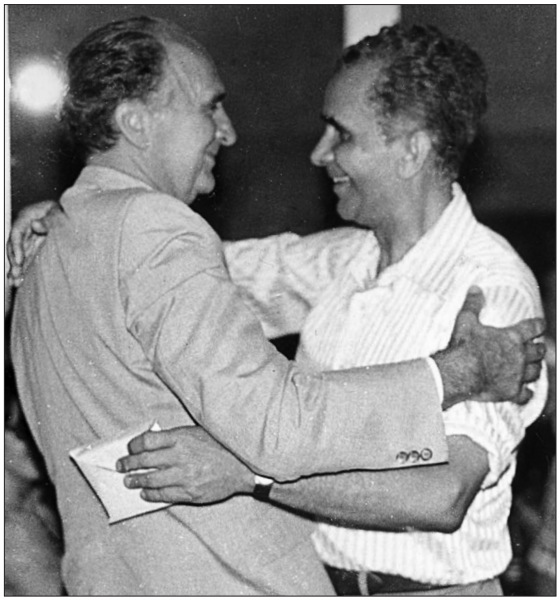
Dorinţa de a cuceri înălţimi inaccesibile şi
plăcerea de a privi lumea de pe culmi neatinse,
l-au călăuzit mereu, atât în viaţa personală,
cât şi în cariera ştiinţifică.

”A rămas drept în apărarea celor mai înalte idealuri,
an după an, ca o stâncă înconjurată de marea dezlănţuită.”
(Isabelle Joris, University of Massachusetts)

”Tatăl l-a dus pentru prima oară pe munte şi a rămas toată viaţa
cu o mare iubire pentru munte. A fost alpinist, schior iar visul său
era să ajungă în Himalaia…”
(Maya Simionescu)

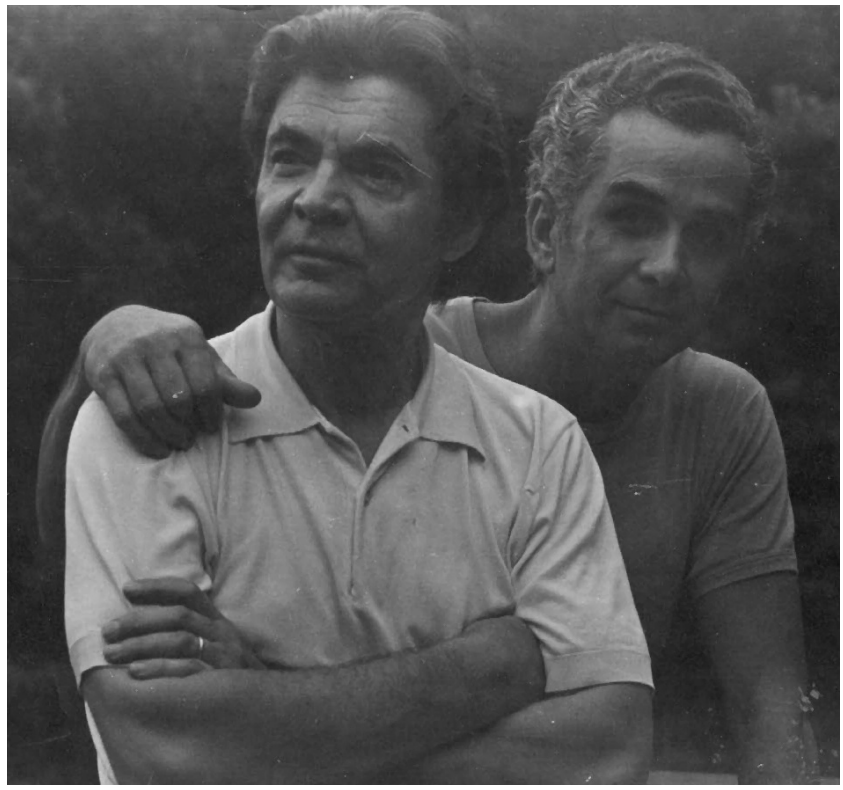
Inaugurarea oficială a Institutului de Biologie şi Patologie Celulară

Primind Premiul "Louis and Arthur Lucian Award
for Research in Circulatory Diseases" (1978) pentru : "Munca de pionierat a câștigătorilor în biologie celulară și citologie promite să ajute la ameliorarea bolii aterosclerotice"



... cu Profesorul Guido Majno

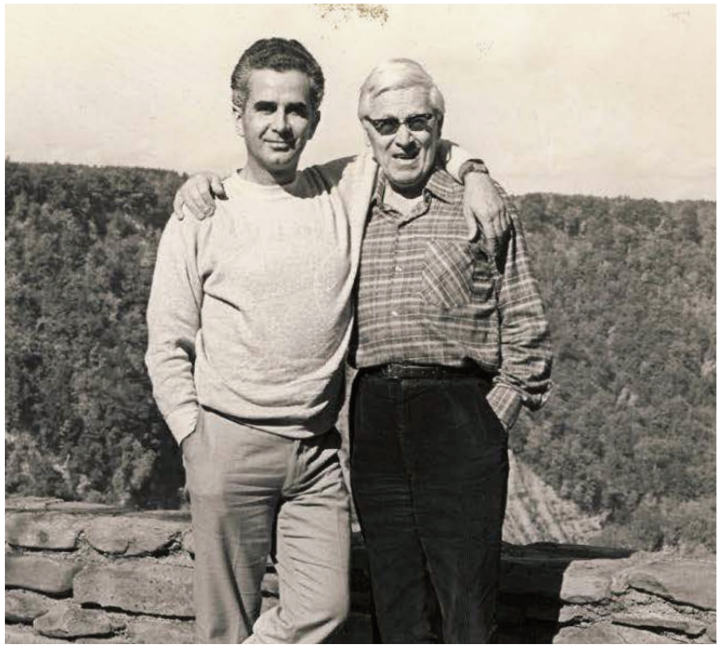
... cu Profesorul Moris Karnowski



Cu Profesorul George E. Palade

... cu Maya Simionescu

... cu Maeilyn Farquhar



... cu Dr. Gică Mănescu

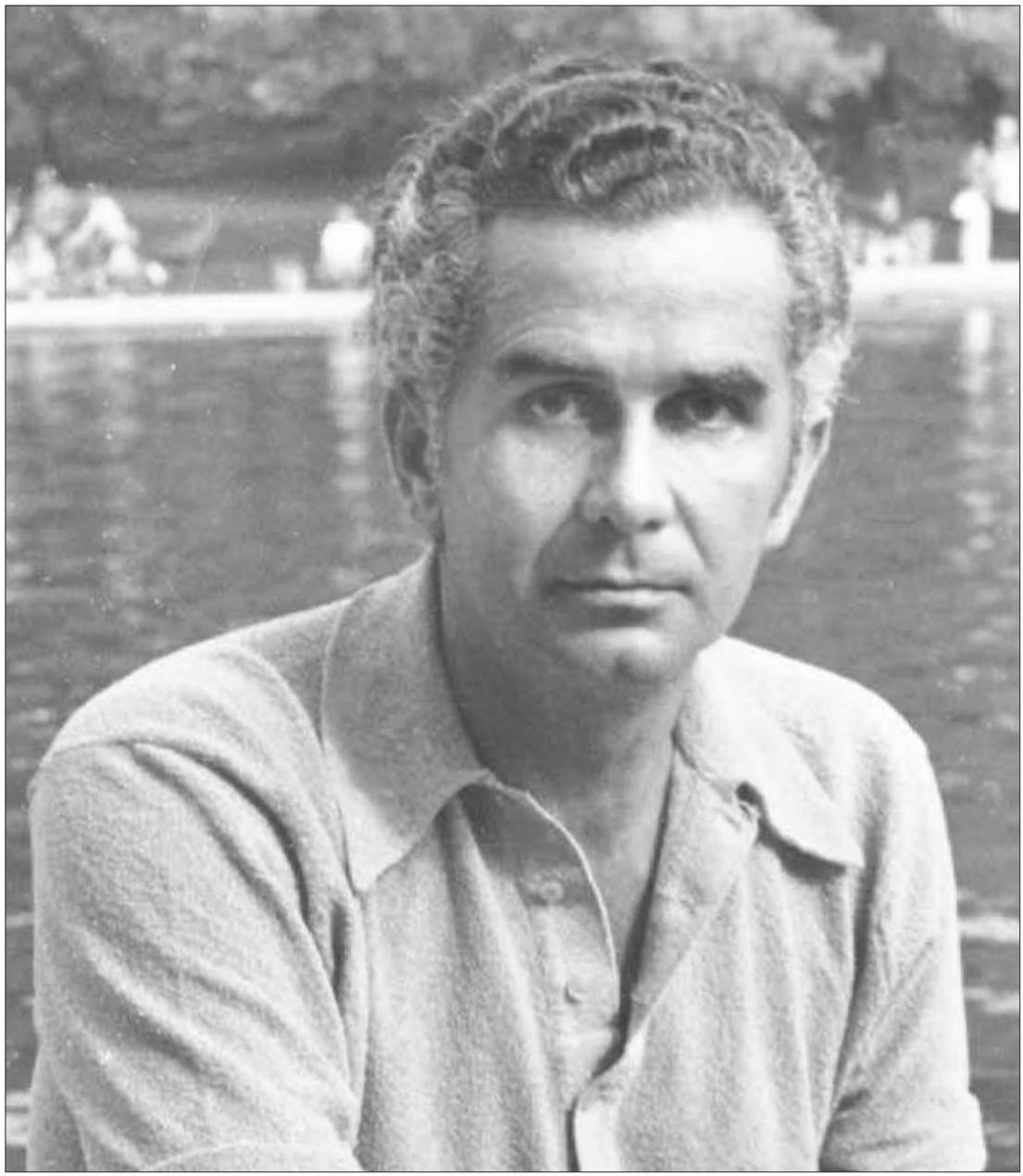
... cu Profesorul Judah Folkman

... cu Profesorul James Jamieson

... cu Profesorul Dan Steinberg

Un monent de relaxare cu tanara echipa a Institutului

OMUL DE ȘTIINȚĂ



Deși pentru comunitatea științifică internațională, el a reprezentat chintesența cercetătorului autentic, în viața sa particulară, a găsit timpul necesar să compună muzică la pian, să picteze și să scrie poezii, fiind și în aceste domenii un admirabil model pentru mai tinerii săi colaboratori.

Prof. Gujdo Majno, University of Massachusetts

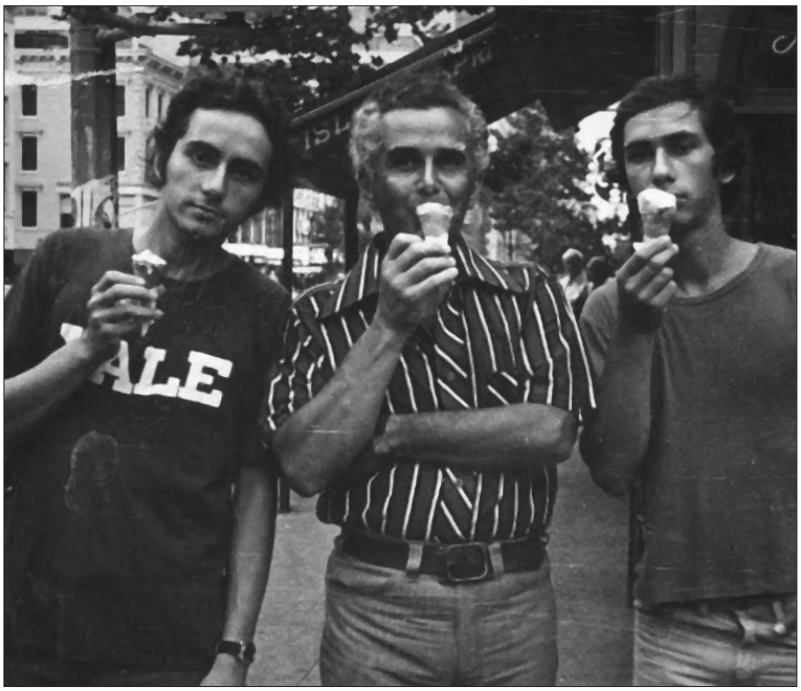
În familie

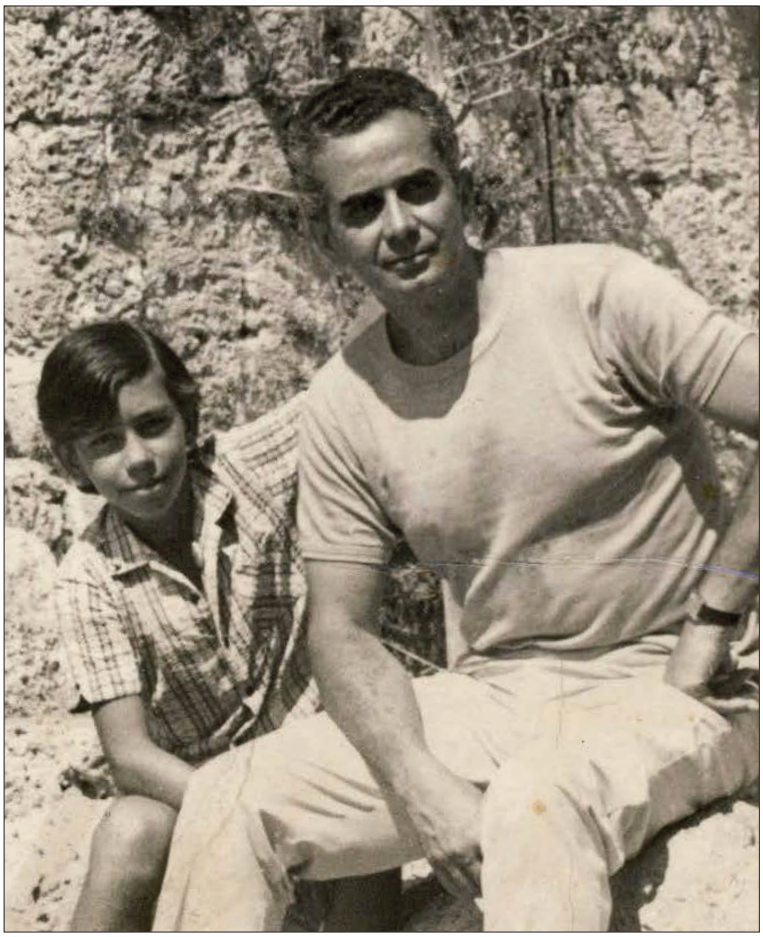
FAMILIA

CUBBO

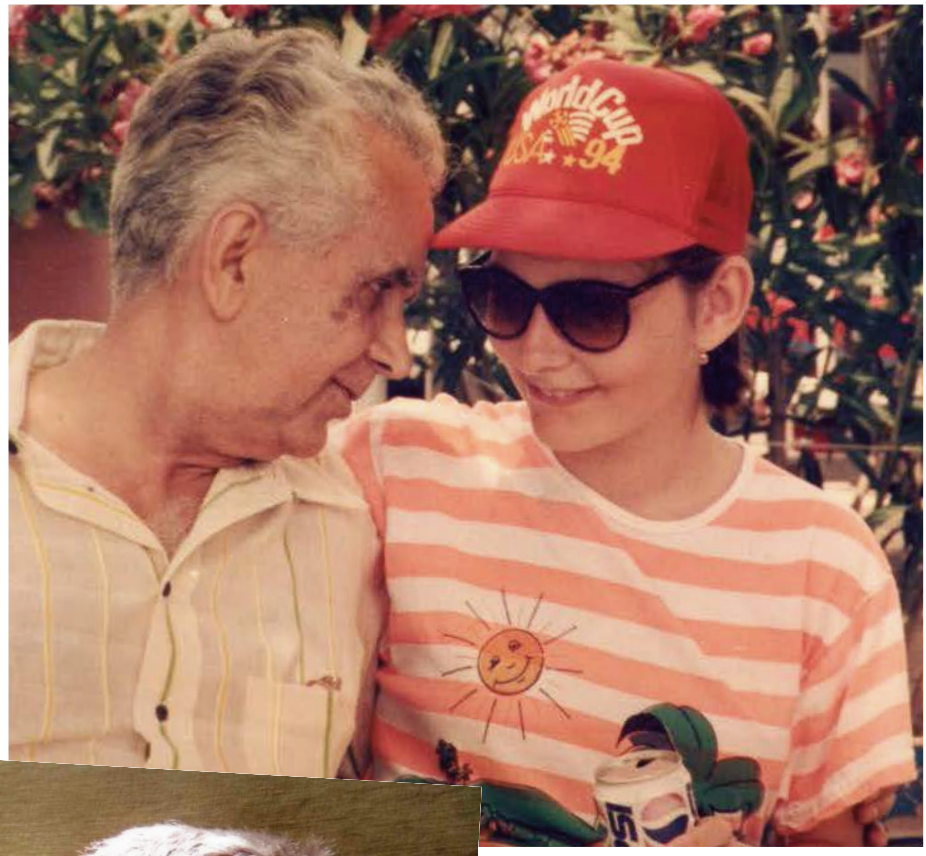
FAMILIA

... cu
Vlad și Dan Simionescu





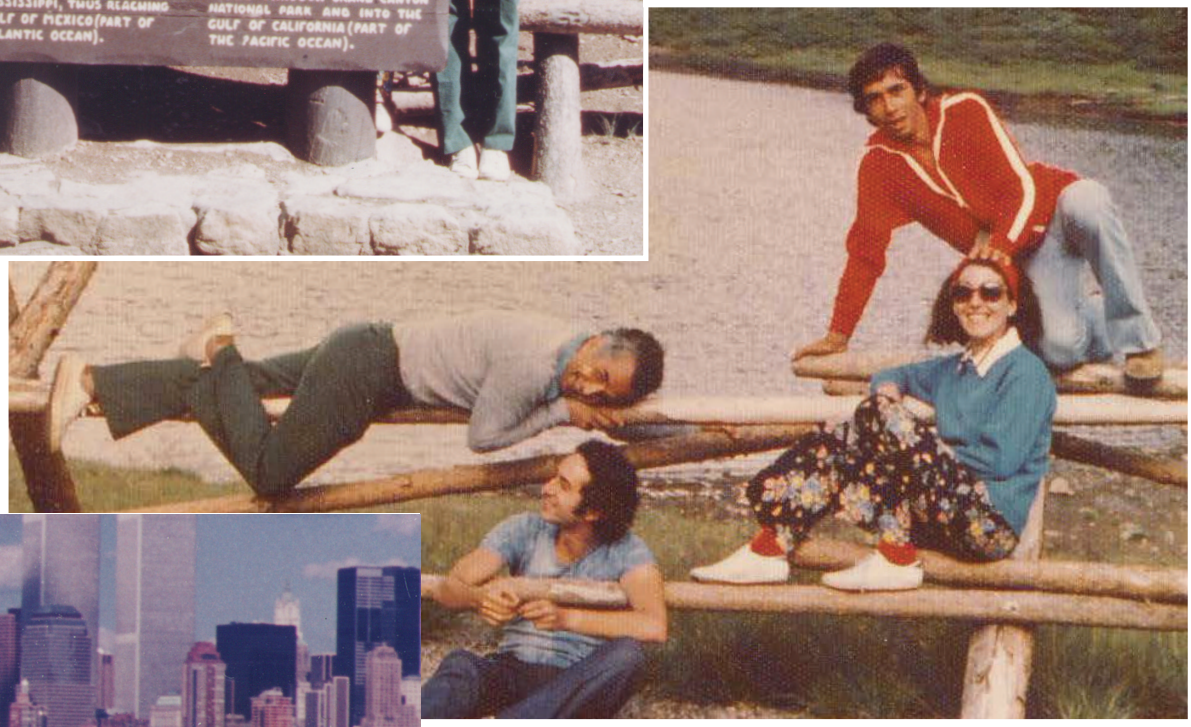
... cu Dan Simionescu, fiu și prieten

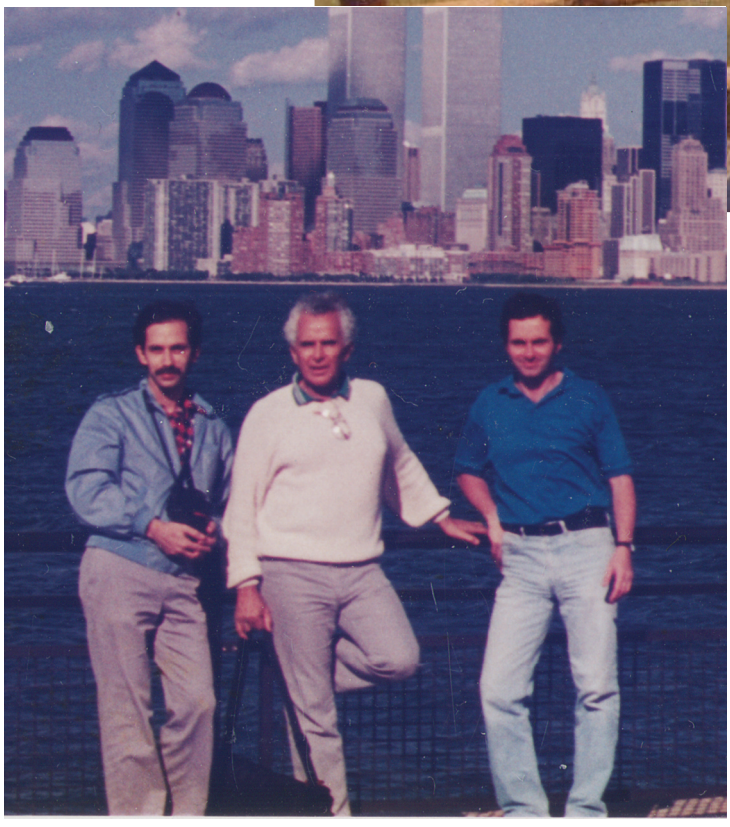


... cu nepoata Adriana

Tudor Nicolae Simionescu:
nepotul pe care și l-a dorit, dar nu l-a văzut niciodată

... la schi - Peștera





... cu familia in SUA

”Nicolae Simionescu
a fost un cetățean al planetei,
dar a fost în primul rând Român prin toată
ființa sa, pâna la ultima sa celulă.
Și-a consacrat întreaga energie edificării
în România, a unei insule de excelență -
la nivel mondial – realizând-o în ciuda
unor enorme dificultăți...

Protejat de extraordinara sa prestanță,
de statura lui științifică și de inspirata sa
imaginație, s-a luptat
pentru viitorul tinerilor români...

Prin dispariția sa, România a pierdut pe
unul dintre cei mai distinși fii ai săi,
dar în același timp, s-a îmbogățit cu
o valoroasă moștenire.”

Prof. Gujdo Majno,
University of Massachusetts

Toate drepturile rezervate
© *Fundația Națională pentru Știință și Artă*

ACADEMIA ROMÂNĂ
Secretar General

ACADEMIA ROMÂNĂ
REGISTRATURA GENERALĂ
Nr. 3878 din 14.10.2021

Către

Biroul Doctorate

Vă facem cunoscut că, în şedinţa din 6 octombrie 2021, Prezidiul Academiei Române a aprobat, în unanimitate, rezultatele admiterii la doctorat în sesiunea septembrie-octombrie 2021 (53 – cu stipendiu; 41 – fără stipendiu).

SECRETAR GENERAL,
Acad. Ioan Dumitrache

ROMANIAN ACADEMY
School of Advanced Studies of the Romanian Academy (SCOSAAR)

CONCISE SYLLABUS OF THE DISCIPLINE:" BIOMEDICAL RESEARCH AT THE CROSS ROAD OF SCIENCE IN THE XXIst CENTURY"

1. Data about the program

1.1 Department	Life, Medical and Agricultural Sciences
1.2 Institution	Romanian Academy
1.3 Domain of study	Biology
1.4 Study cycle	Doctorate

2. Discipline data

2.1 Name of the discipline			**Biomedical research at the cross road of science in the XXIst century**				
2.2 Titleholder of the course activities			Acad. Maya Simionescu				
2.3 Titleholder of the seminar activities			Acad. Maya Simionescu				
2.4 Owner of laboratory activities							
2.5 Year of study	I	**2.6 Semester**	I	**2.7 Type of evaluation**	E*	**2.8 Regime of the discipline**	SD**

3. Estimated total time (hours per semester of teaching activities)

3.1 Number of hours per week	4	**Of which:**			
3.2 course	2	**3.3 seminar**	2	**3.4 laboratory**	0
3.5 Total hours in the curriculum	56	**Of which:**			
3.6 course	28	**3.7 seminar**	28	**3.8 laboratory**	0

Distribution of time fund:	**hours**
Study using textbook, course support, bibliography and notes	60
Additional documentation in the library, on specialized electronic platforms and in the field	100
Preparation of seminars / laboratories, homework, papers, portfolios and essays	100
Tutorial	55
Exams	4
Other activities:	–

3.9 Total individual study hours	319
3.10 Total hours per semester	375
3.11 Number of credits (ECTS)	15

4." Learning outcomes" and specific skills acquired

1. Familiarization of Ph.D. students with the theoretical and practical principles underlying structural and functional biopathology of cardiovascular system in relation with the knowledge acquired in chemistry, biophysics, genetics and mathematics as well as with continuous and independent documentation.
2. Deepening the aspects related to the particularities of inter-relations between structure and function and theoretical and practical experimental modeling in biomedical research.
3. Development and consolidation of skills in a research laboratory in the technological era of biotechnology and applied science.
4. Enhancement of analytical thinking in the programming, development and accomplishment of an experimental model in vivo or in vitro.

5. Evaluation

Type of activity	**5.1 Evaluation criteria**	**5.2 Evaluation methods**	**5.3 Weight of the final grade**
5.4 Course	Acquired knowledge	Written and oral exam	55%
5.5 Seminar	Activity	Discussion, Debate	45%
5.6 Laboratory			
5.7 Minimum standard of performance: Knowledge of 70% of the information contained in the course			

Seminar holder signature

Course titleholder signature
Acad. Maya Simionescu

Seminar titleholder signature
Acad. Maya Simionescu

Laboratory owner signature

*E = Exam. C = Colloquy.
**FD = Fundamental Discipline. SD = Specialty Discipline.

ROMANIAN ACADEMY
INSTITUTE OF CELLULAR BIOLOGY AND PATHOLOGY
"NICOLAE SIMIONESCU'

PhD THESIS

STEM CELL THERAPY FOR MYOCARDIAL INFARCTION: MECHANISMS AND MOLECULAR SIGNALS BY WHICH TRANSPLANATED CELLS CONFERS CARDIOPROTECTION IN ISCHEMIA

SCIENTIFIC SUPERVISOR
Acad. MAYA SIMIONESCU

PhD STUDENT
MIHAI BOGDAN PREDA

BUCHAREST
2013

CONTENTS

FOREWORD ……...…….…...……....1

ABBREVIATIONS …….…….....2

I. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

I.1. Cellular and molecular mechanisms involved in cardiac ischemia-reperfusion ….....3

I.1.1. Acute myocardial infarction …….…….....3

I.1.2. Stages of the repair process of cardiac ischemia-reperfusion ……..…….6

I.1.3. Role of extracellular matrix in cardiac repair process ……..…….…..6

I.1.4. Cell death in ischemia-reperfusion ……...….……..….10

I.2. "Heart conditioning" – therapeutic strategy for cardiac ischemia-reperfusion injury ...……..…….……..……..12

I.2.1. Ischemic conditioning ….…….....……..13

I.2.2. Ischemic postconditioning …….……...……..15

I.2.3. Remote ischemic perconditioning …….……...…..……17

I.2.4. Ischemic preconditioning ……...……..17

I.3. Stem cells and their therapeutic potential in ischemic heart disease ….……19

I.3.1. Brief history of stem cell discovery …….…….…....19

I.3.2. Embryonic stem cells ……....21

I.3.3. Embryonic stem cell potential to generate cardiomyocytes …….……..25

I.3.4. Adult stem cells …….…....30

I.3.4. Mesenchymal stem cells …….……...……...34

I.3.5. Mesenchymal stem cell potential to generate cardiomyocytes ……..…...38

II. ORIGINAL CONTRIBUTIONS

II. 1. Standardization of hindlimb ischemia mouse model ……....41

II.1.1 Introduction and objectives ……...41

II.1.2 Materials and methods …….……42

II.1.3 Results and discussions ……45

II.1.4 Conclusions ……..……47

II.2. Standardization of cardiac ischemia-reperfusion mouse model

...……....47

II.2.1. Introduction and objectives ……...47
II.2.2. Materials and methods ……....49
II.2.3. Results and discussions ……....52
II.2.4. Conclusions ……....56
II.3. Changes induced by ischemia-reperfusion in mouse myocardium ..……58
II.3.1. Introduction and objectives ……..……58
II.3.2. Materials and methods ……....59
II.3.3. Results and discussions ……....63
II.3.4. Conclusions ……....66
II.4. The effect of ischemia on cardiac function in ex vivo Langendorff perfused heart …….……68
II.4.1. Introduction and objectives ……..68
II.4.2. Materials and methods ……....69
II.4.3. Results and discussions ……72
II.4.4. Conclusions ……...……75
II.5. The derivation of embryonic stem cells ……..……75
II.5.1. Introduction and objectives ……..75
II.5.2. Materials and methods ……...……77
II.5.3. Results and discussions ……..……..81
II.5.4. Conclusions ……..87
II.6. The aggregation conditions of embryonic stem cells influence their efficiency to generate contractile cardiomyocytes in vitro ……..88
II.6.1. Introduction and objectives ……..……..88
II.6.2. Materials and methods ……...……89
II.6.3. Results and discussions ……....91
II.6.4. Conclusions ……..95
II.7. Stimulation of cardiac regeneration by combining factors secreted by mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells ..……..…..97
II.7.1. Introduction and objectives ……..…..97
II.7.2. Materials and methods ……..…98
II.7.3. Resultats and discussions ……103

II.7.4. Conclusions ……112
II.8. Subcutaneous transplantation of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue protects the heart against ischemia-reperfusion injury ……114
II.8.1. Introduction and objectives ……114
II.8.2. Materials and methods ……116
II.8.3. Resultats and discussions ……120
II.8.4. Conclusions ……128
III. GENERAL CONCLUSIONS ……..131
IV. REFERENCES ...……...135
V. LIST OF PUBLISHED PAPERS ……158
VI. RESEARCH FUNDING ……...161

KEYWORDS: CARDIOVASCULAR DISEASE, CARDIAC ISCHEMIA-REPERFUSION, LEFT CORONARY ARTERY, EMBRYONIC STEM CELLS, EMBRYOID BODIES, MESENCHYMAL STEM CELLS, REMOTE THERAPY

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide and one of the most important clinical manifestations of these is represented by ischemic heart disease. This pathological condition of the heart is characterized by reduced coronary flow in a certain region of the heart, which results in the appearance of myocardial necrosis due to ischemia. The development of heart failure after myocardial infarction is strongly related to alterations in the geometry, function and structure of heart, that are collectively called "ventricular remodeling".

The current treatment of heart failure can only improve symptoms but can not reverse the loss of myocardial tissue by replacing dead cells with new contracting cardiomyocytes (CMC). The only current alternative to the more severe pathological manifestations of heart failure is heart transplantation, but this therapeutic intervention is limited, not only because of the high costs that are involved, but also due to unavailability of donors.

In these circumstances, stem cell therapy has brought hope in cardiology for the treatment of bouth myocardial infarction and heart failure, being motivated by encouraging pre-clinical results obtained in the last 10 years. These experimental results led to the initiation of the first clinical trials, but their effect has proven far more than modest, showing an improvement in left ventricular ejection fraction of only 2-4%. Moreover, some trials have shown that there are no significant differences in the function of the myocardium with and without cell transplantation, in the long term. The reason was that transplanted cells are poorly retained in infarcted heart and that most of them died after transplantation. Thus, the hypothesis was advanced that the improvement is not due to myocardial regeneration, but is produced by the stem cell-secreted biomolecules, which can help for a period of time the remodelling process. These findings have led to reconsideration of previous observations in the field of stem cells and have called for the development of new strategies for improving survival, grafting and cell differentiation after transplantation.

The main types of stem cells considered as options for regenerative medicine are embryonic stem cells (ESC) and adult stem cells (ASC). ESC are generated from the inner cell mass of the blastocyst before implantation. They are pluripotent cells, being able to differentiate into derivatives of all three germ layers: ectoderm, endoderm and mesoderm. ESC can be maintained in undifferentiated state by culture in specific conditions. When these conditions are changed,

cells begin to differentiate and thus they can be manipulated to be committed to cardiomyocytes (CMC). However, CMC generated from ESC have an immature phenotype, making them currently not usable in clinical settings.

ASC are defined as stem cells/progenitors that remained in the body after the development of the organism. Among these, mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent cells isolated from adult bone marrow and other tissues, which may give rise to adipocytes, osteoblasts and condrocytes and, with lower efficiency, to neurons, CMCs, pancreatic beta cells or liver cells. Endothelial progenitor cells (EPC) are another type of ASC. EPC are hematopoietic cells isolated from bone marrow or peripheral circulation. Although apparently they do not differentiate in CMC, EPC helps myocardial regeneration by promoting angiogenesis and providing protective paracrine signals to CMC.

The present work is divided into two major sections. The first part briefly describes the current state of knowledge and is organized in 3 parts: (i) Cellular and molecular mechanisms involved in cardiac ischemia-reperfusion; (ii) “Heart conditioning” – therapeutic strategy for cardiac ischemia-reperfusion injury; and (iii) Stem cells and their therapeutic potential in ischemic heart disease. The second part of the thesis ("Original Contributions") shows the contribution of this work to the enrichment of the knowledge in the stem cell field and is organized into eight chapters. These chapters presents the standardization and improvement of the experimental models used (the generation of new cell lines of embryonic and adult stem cells and experimental models of myocardial ischemia-reperfusion in vivo, ex vivo and in vitro), and the results obtained on these models; results published (or under publication) in international journals in the field.

A constant concern throughout the entire PhD period was to increase the efficiency of stem cell differentiation into contractile CMC and to take advantage for their properties to obtain a structural and functional improving of the infarcted myocardium. Therefore, in the first part, the studies have focused on the derivation of ESC lines, and getting a good yield of their differentiation into CMC. The results showed that in vitro differentiation in contractile cardiac cells of ESC derived from RAP mice (for the first time reported in the literature) is dependent on the initial number of stem cells used and their level of compaction in embryoid bodies (EB). Replacement of foetal bovine serum (which is most commonly used for in vitro differentiation of

ESC) with KO-SR (Knock-Out Serum Replacement) during aggregation of ESC in EB resulted in improved differentiation in CMC by increasing the percentage of contractile EB generated.

With regard to studies carried out on adult stem cells, they focused mainly on the analysis of the capacity of MSC to induce myocardial regeneration after ischemia-reperfusion injury. For these studies were standardized several experimental models of ischemia-reperfusion, namely: the experimental mouse models of *in vivo* ischemia (mouse with myocardial ischemia-reperfusion obtained by transient ligation of the left coronary artery and the mouse with hindlimb ischemia obtained by permanent ligation of femoral artery), the experimental model of *ex vivo* cardiac ischemia-reperfusion using the Langerdorff system and models of *in vitro* ischemia-reperfusion by incubating heart (foetal, neonatal and adult) sections in conditions of ischemia (the presence of an ischemic buffer that chemically mimics the ischemia and atmosphere of 1% O_2). The main original findings obtained on these models are:

1. Both foetal and adult myocardium are affected by ischemia, as evidenced both by decreased tissue viability after ischemia, and by low levels of phosphorylated enzyme ERK1/2. Although foetal myocardium responds to ischemia by general manifestations of ischemic tissue (increased levels of SDF and VEGF secreted into the culture medium), it is more resistant to post-ischemic reperfusion, as demonstrated by returning of viability to baseline after one day of reperfusion. Besides, foetal myocardium does not respond to the ischemia through the formation of scar tissue, TGF-β levels being decreased in ischemia-reperfusion. Unlike foetal myocardium, adult myocardium responds to ischemia by decreasing levels of CGL and scar tissue formation (shown by increased levels of TGF-β at both mRNA level and in the supernatant). Reperfusion induced inflammatory response (increased IL-6 after 1 hour post-ischemic reperfusion), as well as increased levels of HGF and c-Met, involved in repair process.

2. Both under normoxia, and hypoxia, MSC and EPC have cardioprotective properties and stimulate angiogenesis, through which they can contribute to the regeneration of the ischemic myocardium. None of these populations, alone, can sustain an effective angiogenesis, translated by chemotaxis, adhesion and proliferation of endothelial cells (EC) in vitro. MSC are able to promote migration and adhesion of EC, but cannot sustain their proliferation after adhesion. Unlike MSC, EPC shows complementary effects on angiogenesis, being able to stimulate EC proliferation, but not their adherence to the substrate. Thus, the combination of factors secreted by MSC and EPC has a strong positive effect on the behaviour of EC in vitro, indicating the

possibility of effective therapies for vascular regeneration through simultaneous use of several populations of stem/ progenitor cells.

3. Subcutaneous transplantation of MSC protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury, indicating a possible therapeutic strategy for multiple clinical applications. Transplantation of MSC in a remote region from the myocardium ("remote transplantation"), by a non-invasive method, proliferates but did not migrate detectably from the injection site. These cells produce and secrete a variety of molecules with systemic paracrine role of which were identified PTX3 and TSG-6 (proteins with cardioprotective effects), and a number of cytokines pro- (TNF-α, IL−1β) and anti-inflammatory (IL-10, IL-1Rn), involved in modulating the inflammatory process. The hearts isolated from mice transplanted with MSC shows a significantly reduced infarct area and improved cardiac function after ischemia-reperfusion, compared with hearts isolated from control mice.

4. As another original result, the mouse model of cardiac ischemia-reperfusion emphasizes the importance of ECG recording during LCA ligation, to validate both the ligature, and reperfusion of the vessel. Without adding any major disadvantage in terms of procedure, ECG recording allows for objective validation of ligation (by showing ST height elevation and prolongation of QTc segment) and reperfusion, after releasing the ligation of the vessel (by returning the ECG to normal profile), thus replacing the subjectivity given by the evaluation of the reddish color in the ischemic region of the heart. Moreover, ECG provides important information about the severity of myocardial changes caused by ischemia, demonstrating a correlation between electrocardiography and histological changes obtained after ischemia-reperfusion.

The results presented in this thesis describe some important aspects of molecular signals and mechanisms involved both in the pathophysiology of ischemia-reperfusion injury and stem cell transplant for myocardial infarction, thus contributing to the progress of basic research in the field of both stem cells and cardiovascular disease.

ACADÉMIE ROUMAINE
INSTITUT DE BIOLOGIE ET PATHOLOGIE CELLULAIRE
"NICOLAE SIMIONESCU"

THÈSE DE DOCTORAT

LA THERAPIE AVEC DES CELLULES SOUCHES DANS L'INFARCTUS DU MYOCARDE : MECHANISMES ET SIGNAUX MOLECULAIRES PAR LESQUELS LES CELLULES TRANSPLANTEES CONFERENT CARDIOPROTECTION DANS L'ISCHEMIE

Coordinateur SCIENTIFIQUE
Académicien MAYA SIMIONESCU

DOCTORANT
MIHAI BOGDAN PREDA

BUCAREST
2013

SOMMAIRE

PRÉFACE ..……...…….....1

ABRÉVIATIONS …….…….....2

I. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

I.1. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'ischémie-reperfusion cardiaque …...3

I.1.1. Infarctus aigu du myocarde …….…….....3

I.1.2. Les étapes de cicatrisation des plaies induites par l'ischémie-reperfusion cardiaque ……..6

I.1.3. Rôle de la matrice extracellulaire cardiaque dans le processus de réparation …...6

I.1.4. La mort cellulaire au cours de l'ischémie-reperfusion ……...….……...…….10

I.2. "Conditionnement cardiaque" – stratégie thérapeutique contre les lésions d'ischémie-reperfusion du cœur ……..…..12

I.2.1. Conditionnement ischémique ……...…….....……..13

I.2.2. Post conditionnement ischémique ..……..……..……..……...15

I.2.3. Post conditionnement ischémique à distance …….……..…….……...17

I.2.4. Preconditionnement ischémique …….……...…….…….…...17

I.3. Les cellules souches et leur potentiel thérapeutique dans la maladie cardiaque ischémique ……..…….…..19

I.3.1. Histoire de la découverte des cellules souches ……..…….…....19

I.3.2. Les cellules souches embryonnaires ……...21

I.3.3. Potentiel des cellules souches embryonnaires pour générer des cardiomyocytes ……..……25

I.3.4. Les cellules souches adultes …….…….….…….....30

I.3.4. Les cellules souches mésenchymateuses …….…….…..……...34

I.3.5. Potentiel des cellules souches mésenchymateuses pour générer des cardiomyocytes …….……..……...38

II. CONTRIBUTIONS ORIGINALES

II. 1. Établissement de modèle expérimental d'ischémie fémorale chez la souris ……...41

II.1.1 Introduction et objectifs …….…….…….……..41

II.1.2 Matériels et méthodes ……...42
II.1.3 Résultats et discussion ……..……45
II.1.4 Conclusions ……..…….47
II.2. Établissement d'un modèle expérimental de l'ischémie-reperfusion myocardique chez la souris ……….……....47
II.2.1. Introduction et objectifs …….……47
II.2.2. Matériels et méthodes ……49
II.2.3. Résultats et discussion ……..……..52
II.2.4. Conclusions …….……56
II.3. Les changements induits par l'ischémie-reperfusion myocardique chez la souris .....…….……58
II.3.1. Introduction et objectifs …….……58
II.3.2. Matériels et méthodes ……59
II.3.3. Résultats et discussion ……...63
II.3.4. Conclusions …….……66
II.4. L'effet de l'ischémie sur la fonction du cœur perfusé ex vivo en système Langendorff …….……....68
II.4.1. Introduction et objectifs …….……68
II.4.2. Matériels et méthodes ……69
II.4.3. Résultats et discussion ……..72
II.4.4. Conclusions ……75
II.5. La dérivation de cellules souches embryonnaires de souris ……..……..75
II.5.1. Introduction et objectifs …….……75
II.5.2. Matériels et méthodes ……77
II.5.3. Résultats et discussion ……...81
II.5.4. Conclusions ……87
II.6. L'influence des conditions d'agrégation des cellules souches embryonnaires sur leur efficacité de générer des cardiomyocytes contractiles in vitro ……...…88
II.6.1. Introduction et objectifs ……88
II.6.2. Matériels et méthodes ……89
II.6.3. Résultats et discussion ……91

II.6.4. Conclusions ……95

II.7. Stimulation de la régénération cardiaque par combinaison des facteurs sécrétés par les cellules souches mésenchymateuses et les cellules progéniteurs endothéliales ……97

II.7.1. Introduction et objectifs ……97

II.7.2. Matériels et méthodes ……..98

II.7.3. Résultats et discussion ……103

II.7.4. Conclusions ……..112

II.8. La transplantation sous-cutanée des cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux protège le cœur contre les lésions induite par l'ischémie-reperfusion ..…..…….114

II.8.1. Introduction et objectifs ……...114

II.8.2. Matériels et méthodes ……..……116

II.8.3. Résultats et discussion ……120

II.8.4. Conclusions ……..128

III. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ……..……131

IV. RÉFÉRENCES ……..……..……..135

V. ARTICLES PUBLIÉS ……..……..……168

VI. FINANCEMENT DE LA RECHERCHE ……..……..……161

MOTS-CLÉS: maladies cardiovasculaires, ischémie-reperfusion cardiaque, l'artère coronaire gauche, cellules souches embryonnaires, corps embryoïdes, cellules souches mésenchymateuses, thérapie à distance.

RÉSUMÉ

Les maladies cardiovasculaires représentent la cause principale de décès dans le monde et l'une de leurs plus importantes manifestations cliniques sont les cardiopathies ischémiques. Il s'agit d'un état pathologique du cœur caractérisé par une réduction du débit coronaire dans une certaine région du myocarde, qui se traduit par l'apparition de l'infarctus suivi par la nécrose myocardique due à l' ischémie. Le développement de l'insuffisance cardiaque après un infarctus du myocarde est fortement lié aux altérations de la géométrie, de la fonction et de la structure du cœur, altérations collectivement appelés "remodelage ventriculaire".

Le traitement actuel de l'insuffisance cardiaque peut seulement améliorer les symptômes mais ne peut pas inverser la perte de tissu myocardique par le remplacement des cellules mortes avec des cardiomyocytes (CMC) contractants nouvelles. A présent, la seule alternative valable pour les manifestations pathologiques les plus graves de l'insuffisance cardiaque est la transplantation cardiaque. Pourtant, cette intervention thérapeutique est limitée, non seulement par les coûts élevés, mais aussi par l'indisponibilité des donateurs.

Dans ces circonstances, la thérapie avec des cellules souches, soutenue par les résultats précliniques obtenus au cours des dernières dix années, a fait naître l'espoir dans le domaine de la cardiologie pour le traitement de l'infarctus du myocarde et de l'insuffisance cardiaque. Ces résultats expérimentaux ont conduit au début des premiers essais cliniques, mais leur effet jusqu'au présent est plutôt modeste, montrant une amélioration de la fraction d'éjection ventriculaire gauche de seulement 2-4%. En plus, certaines études ont montré qu'il n'existe pas, dans le long terme, des différences significatives entre la fonction d'un myocarde infarci aillant reçu une greffe de cellules et un sans greffe,. La raison en est que les cellules transplantées sont mal conservées dans le cœur infarci et que la plupart d'entre eux meurent après la transplantation. En conséquence, on a avancé l'hypothèse que l'amélioration cardiaque n'est pas due à la régénération du myocarde, mais aux biomolécules sécrétées par les cellules souches qui peuvent aider pour une période dans le processus de remodelage. Ces conclusions ont eu comme effet la reconsidération des observations antérieures dans le domaine des cellules souches et ont identifié la nécessité d'élaborer des nouvelles stratégies pour améliorer les taux de survie, la prise de greffe et la différenciation des cellules après la transplantation.

Les principaux types de cellules souches pour la thérapie régénérative du myocarde infarci sont les cellules souches embryonnaires (CSE) et les cellules souches adultes (CSA). CSE sont générées à partir de la masse cellulaire interne du blastocyste avant son implantation et sont des cellules pluripotentes, capable de se différencier en cellules issues de n'importe lequel des trois feuillets embryonnaires: ectoderme, endoderme et mésoderme. Elles peuvent être maintenus dans l'état indifférencié en culture dans des conditions spécifiques. Lorsque ces conditions sont modifiées, les cellules commencent à se différencier et il est donc possible de les manipulés pour obtenir des CMC. Toutefois, les CMC générées par les CSE ont un phénotype immature, ce qui les rend à présent inutilisables dans la pratique clinique.

CSA sont les cellules souches / progéniteurs qui restent dans le corps après le développement embryonnaire. Parmi celles-là, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules multipotentes isolées de la moelle osseuse adulte et d'autres tissus qui peuvent générer des lignes adipocytaires, ostéoblastiques et chondrogéniques et, avec une moindre efficacité, des neurones, CMC, cellules bêta-pancréatiques ou des hepatocytes. Un autre type de CSA sont les cellules progéniteurs endothéliales (EPC) qui sont des cellules hématopoïétiques isolées à partir de la moelle osseuse ou de la circulation périphérique. Même si apparemment,elles ne se différencient pas vers CMC, les EPC aident à la régénération du myocarde par la promotion de l'angiogenèse et de la fourniture des signaux paracrines de protection de CMC.

Le présent ouvrage est divisé en deux sections principales. La première section décrit brièvement l'état actuel des connaissances et est organisée en 3 parties: (i) Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'ischémie-reperfusion cardiaque, (ii) “Le conditionnement cardiaque“ – une nouvelle stratégie thérapeutique contre les lésions d'ischémie-reperfusion du cœur et (iii) Les cellules souches et leur potentiel thérapeutique dans la maladie cardiaque ischémique. La deuxième section de la thèse ("Contributions originales») montre l'apport de ce travail à l'enrichissement des connaissances dans le domaine des cellules souches et est organisée en huit chapitres. Ces chapitres présentent la standardisation et l'amélioration des modèles expérimentaux utilisés (la génération de nouvelles lignes de cellules souches embryonnaires et adultes, et des modèles expérimentaux de l'ischémie-reperfusion du myocarde in vivo, ex vivo et in vitro), et les résultats obtenus sur ces modèles; les résultats ont été publiés (ou sont en cours de publication) dans des journaux internationaux dans le domaine d'intérêt.

Une préoccupation constante pendant le stage de doctorat a été d'augmenter l'efficacité de la différenciation des cellules souches en CMC contractiles et de tirer parti des propriétés des cellules souches pour améliorer la structure et la fonction du myocarde infarci. Par conséquent, dans la première partie les études ont été diriges vers la dérivation de lignées de CSE et obtenir un bon rendement de leur différenciation en CMC. Les résultats ont montré que la différenciation in vitro des CSE provenant de souris RAP (pour la première fois rapportées dans la littérature) en cellules cardiaques contractiles est dépendante du nombre initial de cellules souches utilisées et de leur niveau de compactage de corps embryoïdes (EB). Le remplacement du sérum fœtale (qui est le plus fréquemment utilisé pour la différenciation in vitro des CSE) avec KO-SR (Knock-Out serum remplacement) lors de l'agrégation des CSE dans les EB a comme résultat une meilleure différenciation des CMC, en augmentant le pourcentage des EB contractiles produits.

En ce qui concerne les études menées sur des cellules souches adultes, elles se sont concentrées principalement sur l'analyse de la capacité de CSM de favoriser la régénération du myocarde après une lésion induite par l'ischémie-reperfusion. Pour réaliser ces études, plusieurs modèles expérimentaux d'ischémie-reperfusion ont été normalisés, comme il suivi: le modèle expérimental murin d'ischémie in vivo (la souris avec ischémie-reperfusion myocardique, obtenue par la ligature transitoire de l'artère coronaire gauche et la souris avec ischémie des membres postérieurs obtenue, par la ligature permanente de l'artère fémorale), le modèle

expérimental d'ischémie-reperfusion cardiaque ex vivo dans le système Langerdorff et des modèles d'ischémie-reperfusion in vitro par l'incubation des sections de myocarde (fœtale, néonatale et adulte) dans des conditions d'ischémie (la présence d'un tampon ischémique qui imite chimiquement l'ischémie et une atmosphère de 1% O_2). Les principaux résultats originaux obtenus sur ces modèles sont les suivants:

1. Le myocarde fœtal, aussi que celui adulte sont touchés par l'ischémie, fait confirmé par la diminution de la viabilité tissulaire après une heur d'ischémie, et par les niveaux faibles de l'enzyme ERK1/2 phosphorylée. Même si le myocarde fœtal répond à une ischémie pareil au autres tissus ischémiques (augmentation des niveaux de SDF et VEGF sécrétés dans le milieu de culture), il est plus résistant à la reperfusion post-ischémique, comme démontré par le retour aux valeurs normales après un jour de reperfusion. En plus, le myocarde fœtal ne répond pas à l'ischémie par la formation de tissu cicatriciel, les niveaux de TGF-β étant diminuée en cas d'ischémie-reperfusion. Contrairement au myocarde fœtale, le myocarde adulte répond à l'ischémie en réduisant les niveaux de CGL et par formation de tissu cicatriciel (illustré par des niveaux accrus de TGF-β dans les deux surnageants et au niveau d'ARNm). La reperfusion induit une réponse inflammatoire (production accrue d'IL-6 après 1 heure de reperfusion post-ischémique), ainsi que des niveaux accrus de HGF et c-Met, impliqués dans le processus de réparation.

2. Dans des conditions de normoxie, aussi qu'en hypoxie, CSM et CPE ont des propriétés cardioprotecteures et un effet stimulateur de l'angiogenèse, par lesquels elles peuvent contribuer à la régénération du myocarde. Aucune de ces populations, ne peut, par elle même, soutenir une angiogenèse efficace, représentée par l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales (CE) in vitro. CSM sont en mesure de promouvoir la migration et l'adhésion des CE, mais ne peuvent pas soutenir leur prolifération après l'adhésion. Contrairement aux CSM, les CPE montrent des effets complémentaires sur l'angiogenèse, étant capables de stimuler la prolifération des CE, mais pas leur adhésion au substrat. Ainsi, la combinaison de facteurs sécrétés par les CSM et les CPE a un fort effet positif sur le comportement des CE in vitro, indiquant la possibilité de développer des thérapies efficaces pour la régénération vasculaire grâce à l'utilisation simultanée de plusieurs populations de cellules souches / progéniteurs.

3. La transplantation sous-cutanée des CSM protège le myocarde des lésions induites par l'ischémie-reperfusion, et représente une possible stratégie thérapeutique avec des multiples applications cliniques. Les CSM transplantées dans une région éloignée du myocarde ("remote transplantation"), par une méthode non invasive, prolifèrent, mais ne migrent pas du site d'injection. Ces cellules produisent et sécrètent une variété de molécules avec rôle paracrine, dont ont été identifiés PTX3 et STG-6 (protéines ayant des effets cardioprotecteurs), et un certain nombre de cytokines pro- (TNF-α, IL−1β) et anti-inflammatoires (IL-10, IL-1RN), impliquées dans la modulation du processus inflammatoire. Les cœurs isolés des souris transplantées avec CSM montrent une zone d'infarctus considérablement réduite et une amélioration de la fonction cardiaque après l'ischémie-reperfusion, par rapport aux cœurs isolés des souris témoignes.

4. Un autre résultat original est represente par le fait que le modèle murin d'ischémie-reperfusion cardiaques démontre l'importance de l'enregistrement ECG pendant la ligature LCA pour valider à la fois la ligature, aussi que et la reperfusion du vaisseau. Sans ajouter aucun inconvénient majeur en ce qui concerne la procédure, l'enregistrement ECG permet une validation objective de la ligature (l'élévation en hauteur du segment ST et la prolongation de l'intervalle QTc) et la reperfusion, après la libération de la ligature du vaisseau (restoration du profil normal de l'ECG); on peut ainsi éliminer le subjectivisme qui puet accompagner l'évaluation de la couleur rouge dans la région ischémique du cœur. De plus, l'ECG offre des informations importantes sur la gravité des changements provoqués par l'ischémie du myocarde, en démontrant une corrélation entre le profil de l'électrocardiographie et les modifications histologiques obtenues après l'ischémie-reperfusion.

Les résultats présentés dans cette thèse décrivent certains aspects importants concernant les mécanismes et les signaux moléculaires impliqués dans la physiopathologie de l'ischémie-reperfusion et dans la transplantation des cellules souches dans le myocarde ischémique, contribuant ainsi au progrès de la recherche fondamentale dans le domaine des cellules souches, et des maladies cardiovasculaires.

ACADEMIA ROMANA

INSTITUTUL DE BIOLOGIE SI PATOLOGIE CELULARA

“NICOLAE SIMIONESCU”

TEZA DE DOCTORAT

TERAPIA CU CELULE STEM IN INFARCTUL DE MIOCARD: MECANISME SI SEMNALE MOLECULARE PRIN CARE CELULELE TRANSPLANTATE CONFERA CARDIOPROTECTIE IN ISCHEMIE

CONDUCATOR STIINTIFIC

Acad. MAYA SIMIONESCU

DOCTORAND

MIHAI BOGDAN PREDA

BUCURESTI

2013

CUPRINS

CUVANT INAINTE ..……...1

LISTA ABREVIERILOR …….....2

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOSTINTELOR

I.1. Mecanismele celulare si moleculare implicate in ischemia-reperfuzia cardiaca …….3

I.1.1. Infarctul miocardic acut …….…….....3

I.1.2. Etapele procesului reparator al leziunii de ischemie-reperfuzie cardiaca ……...6

I.1.3. Rolul matricei extracelulare cardiace in procesul reparator …….……...6

I.1.4. Moartea celulara in timpul ischemiei-reperfuziei ……...…..…...……..10

I.2. "Conditionarea" cardiaca –strategie terapeutica impotriva leziunii de ischemie-reperfuzie cardiaca ...……..……..12

I.2.1. Conditionarea ischemica ….…….....……...13

I.2.2. Postconditionarea ischemica …….……..……...15

I.2.3. Perconditionarea ischemica indepartata ……..…….….17

I.2.4. Preconditionarea ischemica ……...17

I.3. Celulele stem si potentialul lor terapeutic in boala cardiaca ischemica …..……..19

I.3.1. Scurt istoric al descoperirii celulelor stem …….....19

I.3.2. Celulele stem embrionare ……...21

I.3.3. Potentialul celulelor stem embrionare de a genera cardiomiocite …….……..25

I.3.4. Celulele stem adulte …….....30

I.3.4. Celulele stem mezenchimale (CSM) ……...34

I.3.5. Potentialul celulelor stem mezenchimale de a genera cardiomiocite ……...38

II. CONTRIBUTII ORIGINALE

II. 1. Stabilirea modelului experimental de ischemie femurala la soarece …….....41

II.1.1 Introducere si obiective ……...41

II.1.2 Materiale si metode ……42

II.1.3 Rezultate si discutii ……45

II.1.4 Concluzii ……47

II.2. Stabilirea modelului experimental de ischemie-reperfuzie miocardica la soarece ...……..47

II.2.1. Introducere si obiective ……...47
II.2.2. Materiale si metode ……...49
II.2.3. Rezultate si discutii ……...52
II.2.4. Concluzii ……....56
II.3. Modificari induse de ischemie-reperfuzie in miocardul de soarece ....…….……58
II.3.1. Introducere si obiective ……..…….……58
II.3.2. Materiale si metode ……....59
II.3.3. Rezultate si discutii ……....63
II.3.4. Concluzii ……....66
II.4. Efectul ischemiei asupra functiei cardiace a inimii perfuzate ex vivo in sistem Langendorff …….……..68
II.4.1. Introducere si obiective ……..68
II.4.2. Materiale si metode ……...69
II.4.3. Rezultate si discutii ……72
II.4.4. Concluzii ……75
II.5. Derivarea celulelor stem embrionare de soarece ……75
II.5.1. Introducere si obiective ……..75
II.5.2. Materiale si metode ……77
II.5.3. Rezultate si discutii ……81
II.5.4. Concluzii ……87
II.6. Conditiile de agregare ale celulelor stem embrionare influenteaza eficienta acestora de a genera cardiomiocite contractile in vitro ……..……..88
II.6.1. Introducere si obiective ……..88
II.6.2. Materiale si metode ……89
II.6.3. Rezultate si discutii ……91
II.6.4. Concluzii ……95
II.7. Stimularea regenerarii cardiace prin combinarea factorilor secretati de celulele stem mezenchimale si celulele endoteliale progenitoare ..……..97
II.7.1. Introducere si obiective ……..97
II.7.2. Materiale si metode ……98
II.7.3. Rezultate si discutii ……..103

II.7.4. Concluzii ……..112
II.8. Transplantul subcutan al celulelor stem mezenchimale derivate din tesutul adipos protejeaza inima impotriva leziunii de ischemie-reperfuzie ……..114
II.8.1. Introducere si obiective ……114
II.8.2. Materiale si metode ……..116
II.8.3. Rezultate si discutii ……..120
II.8.4. Concluzii ……..128
III. CONCLUZII GENERALE ……..131
IV. BIBLIOGRAFIE ..…….135
V. LISTA LUCRARILOR PUBLICATE …….158
VI. FINANTAREA CERCETARILOR ……161

CUVINTE CHEIE: boala cardiovasculara, ischemie-reperfuzie cardiaca, artera coronara stanga, celule stem embrionare, corpi embrioizi, celule stem mezenchimale, terapie la distanta.

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Bolile cardiovasculare reprezinta principala cauza a mortalitatii din intreaga lume iar una dintre manifestari clinice cele mai importante ale acestora o reprezinta boala cardiaca ischemica. Aceasta conditie patologica a inimii este caracterizata prin reducerea fluxului coronarian intr-o anumita regiune a inimii, ceea ce are ca rezultat aparitia infarctului miocardic reprezentat de necroza datorata ischemiei cardiace. Dezvoltarea insuficientei cardiace dupa un infarct miocardic este in stransa legatura cu alterarile induse in geometria, functia si structura cardiaca, reunite sub numele de “remodelare ventriculara”.

Tratamentul actual al insuficientei cardiace poate doar imbunatati simptomatologia, dar nu poate reversa pierderea tesutului miocardic prin inlocuirea celulelor moarte cu cardiomiocite (CMC) noi, contractile. Singura alternativa actuala pentru cele mai severe manifestari patologice ale insuficientei cardiace ramane transplantul de inima, insa aceasta interventie terapeutica este limitata, nu doar din cauza costurilor foarte mari pe care le implica, ci si datorita indisponibilitatii donatorilor.

In aceste conditii, terapia cu celule stem a adus o speranta in cardiologie pentru tratamentul infarctului miocardic, dar si al insuficientei cardiace, motivata fiind de rezultatele pre-clinice incurajatoare obtinute in ultimii 10 ani. Aceste rezultate experimentale au determinat initierea primelor trialuri clinice, insa efectul lor s-a dovedit pana in prezent cel mult modest, aratand o imbunatatire a fractiei de ejectie a ventriculului stang de numai 2-4%. Mai mult, unele trialuri au aratat ca nu exista diferente semnificative pe termen lung intre functia unui miocard infarctizat cu transplant celular si fara. Explicatia a fost data de faptul ca celulele transplantate sunt slab retinute in inima infarctizata si ca majoritatea lor mor dupa transplantare. Astfel, a fost avansata ipoteza ca imbunatatirea cardiaca nu este datorata regenerarii miocardului, ci biomoleculelor secretate de celulele stem, care pot ajuta pentru o perioada de timp procesul de remodelare. Aceste concluzii au dus la reconsiderarea observatiilor anterioare in domeniul celulelor stem si au impus necesitatea dezvoltarii de noi strategii pentru imbunatatirea supravietuirii, grefarii si diferentierii celulelor dupa transplantare.

Principalele tipuri de celule stem considerate ca optiuni in terapia regenerativa a infarctului de miocard sunt celulele stem embrionare (CSE) si celulele stem adulte (CSA). CSE, generate din masa celulara interna a blastocistului inainte de implantare, sunt celule pluripotente,

capabile sa se diferentieze in derivati din toate cele trei straturi germinale: ectoderm, endoderm si mezoderm. Ele pot fi mentinute in stare nediferentiata prin cultivare in conditii specifice. Cand aceste conditii sunt eliminate, CSE se diferentiaza, putand fi manipulate pentru directionarea lor spre CMC. CMC generate din aceste celule au insa un fenotip imatur, ceea ce le face inutilizabile in terapia clinica in acest moment.

CSA sunt definite ca celule stem/progenioare care raman intr-un organism dupa dezvoltarea embrionara. Printre acestea, celulele stem mezenchimale (CSM) sunt celule multipotente izolate din maduva osoasa si alte tesuturi adulte, care pot da nastere la linii adipocitare, osteoblaste si condrogenice si, cu o eficienta mai scazuta, la neuroni, CMC, celule beta-pancreatice sau hepatice. Un alt tip de CSA il reprezinta celulele progenitoare endoteliale (CPE), celule hematopoietice izolate din maduva osoasa sau circulatia periferica. Desi se pare ca nu se diferentiaza in CMC, CPE ajuta la regenerarea miocardica prin promovarea angiogenezei si furnizarea de semnale paracrine protectoare pentru CMC.

Lucrarea de fata este structurata in doua capitole importante. Astfel, prima parte prezinta succint stadiul actual al cunostintelor, fiind organizata in 3 subcapitole: (i) Mecanisme celulare si moleculare implicate in ischemia-reperfuzia cardiaca; (ii) “Conditionarea” cardiaca – o noua strategie terapeutica impotriva leziunii de ischemie-reperfuzie cardiaca; si (iii) Celulele stem si potentialul lor terapeutic in boala cardiaca ischemica. Partea a doua a tezei (“Contributii originale”) prezinta aportul acestei lucrari la imbogatirea cunostintelor din domeniul celulelor stem, fiind organizata pe 8 subcapitole. Aceste subcapitole prezinta standardizarea si imbunatatirea modelelor experimentale utilizate (obtinerea de noi linii de celule stem embrionare si adulte si modelele experimentale de ischemie-reperfuzie miocardica in vivo, ex vivo si in vitro) si rezultatele obtinute pe aceste modele, rezultate publicate (sau in curs de publicare) in reviste internationale in domeniu.

O preocupare constanta de-a lungul intregii perioade de doctorat a constituit-o cresterea eficientei de diferentiere in vitro a celulelor stem in CMC contractile si exploatarea proprietatilor celulelor stem pentru imbunatatirea structurala si functionala a miocardului infarctizat. In acest sens, in prima parte studiile s-au concentrat pe derivarea de linii de CSE si obtinerea unui randament cat mai bun al diferentierii lor in CMC. Rezultatele obtinute au aratat ca diferentierea in vitro a CSE obtinute din linia de soareci RAP (pentru prima data raportate in literatura) in celule cardiace contractile este dependenta de numarul initial de celule stem utilizate si de gradul

de compactare al acestora la nivelul corpilor embrioizi (EB). Inlocuirea serului fetal (cel mai frecvent utilizat pentru diferentierea in vitro a acestor celule) cu KO-SR (Knock-Out Serum Replacement) in timpul agregarii EB are ca rezultat imbunatatirea diferentierii CSE in CMC, prin cresterea procentului de EB contractili generati. Luand in considerare aceste aspecte, initierea agregarii CSE in prezenta de KO-SR poate fi importanta pentru decizia de diferentiere a CSE in CMC si pentru imbunatatirea gradului de diferentiere cardiogenica a EB.

In ceea ce priveste studiile realizate pe celule stem adulte, acestea s-au axat in principal pe analiza capacitatii CSM de a induce regenerarea miocardica in conditii de ischemie-reperfuzie. Pentru aceste studii, au fost standardizate cateva modele experimentale de ischemie-reperfuzie si anume: modelul experimental de ischemie ***in vivo*** (soarece cu ischemie-reperfuzie miocardica, obtinut prin ligaturarea tranzienta a arterei coronare stangi), modelul de ischemie-reperfuzie cardiaca ***ex vivo*** in sistem Langerdorff si modele de ischemie-reperfuzie ***in vitro*** prin incubarea sectiunilor de miocard (fetal, neonatal si adult) in conditii de ischemie (prezenta unui tampon ischemic, ce mimeaza din punct de vedere chimic ischemia si atmosfera de 1% O_2). Principalele rezultate originale obtinute prin studiile efectuate pe aceste modele au aratat ca:

1. Atat miocardul fetal, cat si cel adult, este afectat de ischemie, fapt ilustrat atat prin scaderea viabilitatii tisulare dupa o ora de ischemie, cat si prin valorile scazute ale enzimei ERK1/2 fosforilate. Cu toate ca miocardul fetal raspunde la ischemie prin manifestarile generale ale tesuturilor ischemice (cresterea valorilor de SDF si VEGF secretate in mediul de cultura), el este mult mai rezistent la reperfuzia post-ischemica, fapt demonstrat prin revenirea la valorile initiale dupa o zi de reperfuzie. In plus, miocardul fetal nu raspunde la ischemie prin formare de tesut cicatrizant, dimpotriva valorile TGFβ scad in ischemie-reperfuzie. Spre deosebire de miocardul fetal, miocardul adult raspunde la ischemie prin scaderea nivelelor de CGL si formare de tesut cicatrizant (ilustrat prin cresterea nivelelor de TGFβ, atat in supernatant, cat si la nivel de mRNA). Reperfuzia induce raspuns inflamator (cresterea de IL-6 dupa 1 ora de reperfuzie post-ischemica), ca si cresteri ale nivelelor de HGF si c-Met, implicate in reparare.

2. Atat in conditii normoxice, cat si hipoxice, CSM si CPE au proprietati cardioprotectoare si de stimulare a angiogenezei, prin care pot contribui la regenerarea miocardului infarctizat. Nici una dintre aceste populatii, singura, nu poate insa sustine o angiogeneza eficienta, tradusa prin aderarea si proliferarea celulelor endoteliale (CE) in vitro. CSM au proprietatea de a promova migrarea si aderarea CE, insa nu pot sustine proliferarea lor

dupa aderare. Spre deosebire de CSM, CPE prezinta efecte complementare asupra angiogenezei, putand stimula proliferarea CE, dar nu si aderarea acestora la substrat. Combinarea factorilor secretati de aceste celule are un puternic efect pozitiv asupra comportamentului CE in vitro, ceea ce indica posibilitatea unei terapii eficiente de regenerare vasculara prin utilizarea simultana a mai multor populatii de celule stem/progenitoare.

3. Transplantul subcutan de CSM protejeaza miocardul de leziunea de ischemie-reperfuzie, reprezintand o posibila strategie terapeutica cu multiple aplicatii clinice. CSM implantate intr-o regiune indepartata de miocard ("remote transplantation"), printr-o metoda neinvaziva, prolifereaza, dar nu migreaza de la locul de injectare. Aceste celule produc si secreta sistemic o varietate de molecule cu rol paracrin, dintre care au fost identificate PTX3 si TSG-6 (proteine cu efecte cardioprotectoare), precum si o serie de citokine pro- (TNF-α, IL–1β) si anti-inflamatoare (IL-10, IL-1Rn), implicate in modularea procesului inflamator. Inimile izolate de la soareci astfel transplantati cu CSM prezinta o arie de infarct scazuta si o imbunatatire a functiei cardiace in urma ischemiei-reperfuziei, comparativ cu inimile izolate de la soareci netransplantati.

4. Ca un alt rezultat original, modelul de soarece cu ischemie-reperfuzie cardiaca demonstreaza importanta inregistrarii ECG pe parcursul interventiei chirurgicale de ligatura LCA, atat pentru validarea ligaturii, cat si a reperfuziei vasului. Fara a adauga nici un dezavantaj major in ceea ce priveste procedura, inregistrarea ECG ofera posibilitatea de validare obiectiva a ligaturarii (prin cresterea inaltimii segmentului ST si prelungirea segmentului QTc) si a reperfuziei vasului dupa eliberarea ligaturii (prin revenirea ECG la profilul normal), inlocuind astfel subiectivismul dat de observarea disparitiei culorii rosiatice in regiunea ischemica a inimii. In plus, utilizarea electrocardiogramei ofera informatii importante cu privire la severitatea modificarilor miocardului determinate de ischemie, demonstrandu-se o corelatie intre profilul ECG si modificarile histologice obtinute dupa ischemie-reperfuzie.

Rezultatele prezentate in aceasta lucrare descriu cateva aspecte importante ale mecanismelor si semnalelor moleculare implicate atat in patofiziologia ischemiei-reperfuziei cardiace, cat si in efectul transplantului cu celule stem asupra miocadului ischemic, contribuind astfel la progresul cercetarii fundamentale stiintifice in domeniul celulelor stem si al bolilor cardiovasculare.

The 12th Central and Eastern European Proteomic Conference

jointly with

The 39th Anniversary of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"

ADVANCES IN PROTEOMICS AND PROGRESS IN PRECISION MEDICINE

October 24-26, 2018, Bucharest, Romania

BOOK OF ABSTRACTS

Organizers

Romanian Academy

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"

ROMÂNIA
1918-2018 | SĂRBĂTORIM ÎMPREUNĂ

PLATINUM SPONSOR

LKB

Excellence in Routine and Science

Malvern
Panalytical

Distributor
GE Healthcare
LKB ROMANIA SRL

GOLD SPONSORS

Chromaktiv

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

SILVER SPONSORS

RONEXPRIM
WE DELIVER PERFORMANCE

Malvern Panalytical
Authorized Distributor

ProAnalysis®

thermo scientific
Authorized Distributor

Dexter com
Life Science For You

Promega

BRUKER

MECRO SYSTEM

Laboratorium
Life Science
Together A Step Forward

The 12th Central and Eastern European Proteomic Conference

jointly with

The 39th Anniversary of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"

October 24 – 26, 2018, Bucharest, Romania

Organized by:
The Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" and Romanian Academy, Bucharest, Romania

ORGANIZING COMMITTEE

Acad. Maya Simionescu, director of ICBP "N. Simionescu"
Dr. Felicia Antohe, head of Proteomics Department
Drs. Luminița Ivan, Elena Uyy, Raluca Maria Boteanu, Viorel Iulian Şuică

CEEPC ADVISORY BOARD

Günter Allmaier (Vienna, Austria)
Felicia Antohe (Bucharest, Romania)
Katarina Davalieva (Skopje, Republic of Macedonia)
László Drahos (Budapest, Hungary)
Suresh Jivan Gadher (Frederick, USA)
Hana Kovarova (Liběchov, Czech Republic)
Łukasz Marczak (Poznan, Poland)
Aleš Svatoš (Jena, Germany)
Ľudmila Tkáčiková (Kosice, Slovakia)
Károly Vékey (Budapest, Hungary)

WELCOME ADDRESS

Dear Friends and Colleagues,

We, the Organizing committee and the CEEPC Board have the great pleasure to welcome you all to the 12th Central and Eastern European Proteomic Conference in Bucharest, initiated in the first meeting in Prague, Czech Republic in 2007 by Hana Kovarova and Suresh Jivan Gadher. The conference will be held together with the 39th Anniversary of the Institute of Cellular Biology and Pathology "N. Simionescu", the 2018 host of the event.

We salute the presence of eminent speakers and young researchers with whom to share novel ideas and fascinating research, for all to enjoy.

Promoting the European Union international cooperation principles, we are honored to welcome scientists from Europe and USA participating to our Conference, showing again that science is an international enterprise that need to be shared, continuously improved and finally to serve the human kind.

In keeping with the CEEPC philosophies, we have put together a multidisciplinary program focusing on a central theme *Advances in Proteomics and Progress in Precision Medicine*. We hope this topic will not only expand our knowledge in proteomics but also will open diverse new emerging research areas. We will discuss the diverse scientific, clinical and proteomic challenges and the means by which to speed up the translation of findings into viable solutions and /or therapies for diseases affecting mankind.

We hope you will enjoy the Romanian hospitality, the academic heritage of Bucharest, the productive interactions, networking and friendship.

We wish you a fruitful Conference and a pleasant stay in Romania!

The Organizing Committee

Conference program

Wednesday, October 24, 2018

09.00 – 09.30 Registration

Location: Institute of Cellular Biology and Pathology, "Nicolae Simionescu" (ICBP-NS), 8 B.P. Hasdeu Street, Bucharest

Session 1: 9.30 – 12.00
Chair: Maya Simionescu

Annual Report: on the road from the laboratory bench to precision medicine

Location: "George Palade" auditorium of ICBP-NS

09.30 – 10.00 **Maya Simionescu,** Director of ICBP-NS, Bucharest, Romania
ICBP-NS at 39 years

10.00 – 10.15 **Ileana Mânduțeanu,** Department of Biopathology and Therapy of Inflammation, ICBP-NS

10.15 – 10.30 **Anca Volumnia Sima,** Department of Lipidomics, ICBP-NS

10.30 – 10.45 **Felicia Antohe,** Department of Proteomics, ICBP-NS

10.45 – 11.00 **Alexandrina Burlacu,** Department of Regenerative Medicine, ICBP-NS

11.00 – 11.15 **Anca Violeta Gafencu,** Department of Genomics Transcriptomics and Molecular Therapies, ICBP-NS

11.15 – 11.30 **Adrian Manea,** Department of Genomics Transcriptomics and Molecular Therapies, ICBP-NS

11.30 – 11.45 **Adriana Georgescu,** Department of Pathophysiology and Pharmacology, ICBP-NS

11.45 – 12.00 **Irina Titorencu,** Department of Regenerative Medicine, Laboratory of Mesenchymal Stromal Cells Therapy, ICBP-NS

12:00 – 13:00 Lunch

Location: ICBP-NS, 8 B.P. Hasdeu Street

Session 2: 14.00 – 15.50

Co-Chairs: Maya Simionescu, Suresh Jivan Gadher

Opening ceremony of the 12th CEEPC

Location: The Romanian Academy, 125 Calea Victoriei

14.00 – 14.10 **Victor Voicu,** Member and Vice-president of the Romanian Academy, Bucharest, Romania

14.10 – 14.20 **Diana Loreta Păun,** Professor, State Adviser, Department of Public Health, Presidential Administration, Romania

14.20 – 14.40 **Maya Simionescu,** Director of ICBP-NS, Bucharest, Romania
The path to precision medicine: understanding diseases of cell organelles

14.40 – 15.00 **Suresh Jivan Gadher,** Founder Member of CEEPC, K.N. Oxford, United Kingdom
Credibility, cohesion and vision for Central and Eastern European Proteomic Conference

15.00 – 15.20 **Felicia Antohe,** ICBP-NS
Omics frontiers for personalized medicine

15.20 – 15.50 **Ales Svatos,** Max Planck Institute for Chemical Ecology, Jena, Germany
Solving the yellow mystery of Papaver nudicaule with an integrated – omics approach

15.50 – 16.10 Coffee break

Session 3: 16.10 – 17.30

Co-Chairs: Felicia Antohe, Ales Svatos

16.10 – 16.50 **Shlomo Sasson**, Institute for Drug Research, Faculty of Medicine, The Hebrew University, Jerusalem, Israel
Exploring glucolipotoxicity in pancreatic beta cells by combining advanced confocal analysis of the subcellular lipid map with proteomics

16.50 – 17.30 **Ingrid Miller,** Institute for Medical Biochemistry, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria
Challenges in Proteomics

18.00 – 20.00 **Welcome and get-together party** *(Location: House of Scientists, 9 Lahovary Plaza, Bucharest)*

Thursday, October 25, 2018
Location: ICBP-NS, 8 B.P. Hasdeu Street

08.30 – 09.00 Registration

Session 4: 9.00 – 10.30
Co-Chairs: Suresh Jivan Gadher, Anca Volumnia Sima

09.00 – 09.40 **Rainer Bischoff**, Groningen Research Institute of Pharmacy, University of Groningen, Groningen, Netherlands
Biomarker discovery and validation – from shotgun proteomics to targeted methods

09.40 – 09.55 **Mangesh Bhide**, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Kosice, Slovakia
Factor H binding proteins of Borrelia: immune evasion tools

09.55 – 10.10 **Jiri Petrak**, BIOCEV, First Faculty of Medicine, Charles University, Vestec, Czech Republic
The Pitchfork Strategy. A multi-pronged approach for membrane proteome profiling

10.10 – 10.30 **Linda Keller,** Application Specialist GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany
Efficient coverage analysis for HCP ELISA assay validation

10.30 – 11.00 Coffee break and poster session

Session 5: 11.00 – 12.35
Co-Chairs: Shlomo Sasson, Ileana Mânduțeanu

11.00 – 11.30 **Mădălina Oppermann**, Thermo Fisher Scientific, Stockholm, Sweden
Wide and Deep: New Reagents and Workflows for Multiplexed Quantification and Targeted Analysis

11.30– 11.45 **Brînduşa Alina Petre**, "Alexandru Ioan Cuza" University of Iaşi, Iaşi, Romania
Molecular identification of nitro-tyrosine modification in human eosinophil proteins by proteolytic affinity extraction - mass spectrometry (PROFINEX)

11.45 – 12.15 **Suresh Jivan Gadher,** Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA.
Synergistic success of proteo - genomics in interrogating exotic biological fluids using a novel high sensitivity Immunoassay

12.15 – 12.35 **Matt Kennedy**, Waters HRMS Business Development Manager, Wilmslow, United Kingdom
The Next Generation of IMS Research Platform

12.35 – 13.45 **Lunch**

Session 6: 13.45 – 15.10
Co-Chairs: Juan Jivan Calvete, Mădălina Opperman

13.45 – 14.25 **Theo Marten Luider**, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, Holland
Identification of Antibodies by integration of mass spectrometry and DNA sequencing

14.25 – 14.40 **Helena Kupcova Skalnikova,** Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Libechov, Czech Republic
Cytokine profiling in melanoma patient serum for monitoring of cancer progression

14.40 – 14.55 **Cristiana Tănase**, National Institute of Pathology "Victor Babes", Bucharest, Romania
Proteomic approaches for the evaluation of natural products in cancer prevention and therapy

14.55 – 15.10 **Martina Macht**, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany
Unleashing the power of QTOF technology for proteomics with TIMS and PASEF

15.10 – 15.40 **Coffee break and poster session**

Session 7: 15.40 – 17.15
Co-Chairs: Goran Mitulović, Manuela Călin

15.40 – 16.10 **László Drahos**, Research Centre for Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary
Selection of Collision Energies in Tandem Mass Spectrometry Based Proteomics

16.10 – 16.25 **Tom Dennison**, Malvern Panalytical, UK
Characterising Extracellular Vesicles with Nanoparticle Tracking Analysis

16.25 – 16.45 **Manuela Călin,** ICBP-NS, Bucharest, Romania
Targeted nanocarriers to ameliorate vascular inflammation

16.45 – 17.00 **Tanja Panić-Janković**, Medical University of Vienna, Vienna, Austria
Background Proteins in Human Chorionic Gonadotropin Pharmaceutical Formulations of Different Origin

17.00 – 17.15 **Viorel Iulian Şuică,** ICBP-NS**,** Bucharest, Romania
Proteomic alterations induced by poly (2-ethyl butyl cyanoacrylate) nanoparticles

17.15 – 17.45 **CEEPC Board Meeting**

19.00 – 21.00 **Conference dinner** *(Location: Ramada Bucharest Parc, 3-5 Poligrafiei Ave, 1st District, Bucharest, Romania)*

Friday, October 26, 2018

Location: ICBP-NS, 8 B.P. Hasdeu Street

Session 8: 09.00 – 10.30

Co-Chairs: Jiri Petrak, Cornelia Bala

09.00 – 09.40 **Fernando J. Corrales,** National Centre for Biotechnolgy (CSIC), Madrid, Spain
One carbon metabolism and protein methylation. Implications in liver diseases

09.40 – 09.55 **Goran Mitulović,** Medical University of Vienna, Vienna, Austria
Micro-Pillar-Arrayed Column (µPAC) for Proteomics

09.55 – 10.10 **Cornelia Bala,** Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania
Branched-chain and aromatic amino acids in diabetes – application of metabolomics in clinical settings

10.10 – 10.30 **Filip Supljika,** Application Specialist of Malvern Panalytical, Zagreb, Croatia
Studying Proteomics with Microcalorimetry

10.30 – 11.00 **Coffee break and poster session**

Session 9: 11.00 – 12.30

Co-Chairs: Piotr Widlak, Mirela Sârbu

11.00 – 11.40 **Cristina Furdui**, Center for Redox Research in Biology and Medicine, Wake Forest School of Medicine, Winston-Salem, USA
Integrating Redox Effects in Analysis of Biological Systems

11.40 – 11.55 **Mirela Sârbu**, National Institute for Research and Development in Electrochemistry and Condensed Matter, Timişoara, Romania
Introducing ion mobility tandem mass spectrometry in glycoproteomics and glycolipidomics of human biopsies

11.55 – 12.10 **Xaveer Van Ostade**, University of Antwerp, Wilrijk, Belgium
Characterizing the molecular mechanism of the multifunctional antitumor compound withaferin A in a multiple myeloma model

12.10 – 12.30 **Adrian Manea, ICBP-NS,** Bucharest, Romania
Histone deacetylases as potential therapeutic targets in atherosclerosis

12.30– 13.45 **Lunch**

Session 10: 13.45 – 15.25
Co-Chairs: Cristina Furdui, Adrian Manea

13.45 – 14.25 **Juan Jose Calvete**, Evolutionary and Translational Venomics Laboratory, CSIC, Valencia, Spain
From low-resolution toxin-pattern recognition to toxin-resolved venom proteomes: New approaches in evolutionary and translational venomics

14.25 – 14.55 **Piotr Widlak**, Maria Sklodowska-Curie Institute - Oncology Center, Gliwice Branch, Gliwice, Poland
Discrimination of oral cancer from normal oral mucosa by mass spectrometry imaging of proteins and lipids

14.55 – 15.10 **Katarina Davalieva**, Research Centre for Genetic Engineering and Biotechnology "Georgi D Efremov", Macedonian Academy of Sciences and Arts, Skopje, Republic of Macedonia
Application of tissue proteomics for understanding the prostate cancer initiation and progression

15.10 – 15.25 **Oleksii Ivanov** – Promega GmbH, Mannheim, Germany
The Bioluminescent HiBiT Technology for CRISPR – Mediated Gene Tagging

15.25 – 16.00 **Coffee break and poster session**

Session 11: 16.00 – 16.30
Co-Chairs: László Drahos, Viorel Iulian Şuică

16.00 – 16.15 **Suresh Jivan Gadher**, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA.
Personalized cancer immunotherapy using GM-CSF to activate the body defense

16.15 – 16.30 **Raluca Boteanu**, ICBP-NS, Bucharest, Romania
Proteomic and bioinformatic analyses of bone healing using titanium implant with bioactive targeted surface in a rat tibial defect model

16.30 – 17.00 **Closing Remarks**

LIST OF POSTERS

Thursday, October 25, 2018

ThPo1 *Rebizak B., Mielczarek P., Bodzon-Kulakowska A.,* **Western Blotting – the devil is in the details**

ThPo2 *Skowronek A., Marczak L., Rutkowski T., Widlak P., Pietrowska M.,* **Profiling of serum metabolome of head and neck cancer patients undergoing radiotherapy**

ThPo3 *Zamfir A.D., Sârbu M., Vukelić Ž.,* **Analyses of glycolipid-peptide and glycolipid-protein interactions by chip-based mass spectrometry**

ThPo4 *Bazylak G., Pan T.L., Wang P.W., Leu Y.L., Wu T.H., Wu Y.C.,* **Proteomics discloses effect of saffron stigmata ethanolic extract on restoring viability in HepG2 cells under VCP gene silencing**

ThPo5 *Ionescu A.E., Menţel M., Leney A.C., Munteanu C.V.A., Heck A.J., Szedlacsek S.E.,* **EYA3 tyrosine phosphorylation by Src kinase from mass spectrometry to implications in proliferation**

ThPo6 *Marinescu G.C., Popescu R.G., Dinischiotu A.,* **Nicotinamide mononucleotide (NMN) effects on mitochondrial OXPHOS protein expression**

ThPo7 *Chiriţoiu G.N., Munteanu C.V.A., Jandus C., Ghenea S., Romero P., Petrescu S.M.,* **Mass spectrometry and T cell analysis reveals that N-glycosylation can impact antigen presentation in melanoma**

ThPo8 *Bielińska I., Sikora M., Jakubowski H.,* **Methionine-induced hyperhomocysteinemia causes changes in the mouse kidney proteome associated with blood coagulation**

ThPo9 *Jankovska E, Vit O., Svitek M., Holada K., Petrak J.,* **Two strategies for processing of human cerebrospinal fluid prior LC-MS/MS**

ThPo10 *Ner-Kluza J., Milewska A., Dąbrowska A., Mielczarek P., Pyrć K., Suder P.*, **iTRAQ based proteomic analysis of Zika virus infection based on 293T cells**

ThPo11 *Piechura K., Zingale G.A., Mielczarek P., Silberring J.,* **Activity of neuropeptides converting enzymes**

ThPo12 Smirnova L., Dmitrieva E., Seregin A., Letova A., Semke A., Zgoda V., **Search of peripheral markers associated with pathogenesis of schizophrenia**

ThPo13 *Gawin M., Wojakowska A., Pietrowska M., Marczak Ł., Chekan M., Widłak P.,* **Proteome profiles of different types of thyroid cancers**

ThPo14 *Abramowicz A., Marczak Ł., Smolarz M., Gładysińska M., Widłak P., Pietrowska M.,* **Ionizing radiation affects the composition of proteome of exosomes released by head and neck carcinoma in vitro**

ThPo15 *Behounek M., Chmel M., Havlenova T., Melenovsky V., Cervenka L., Petrak J.,* **Molecular changes in kidneys during chronic heart failure**

ThPo16 *Ner-Kluza J., Kosowicz K., Milewska A., Dąbrowska A., Pyrć K.A., Suder P.,* **ZIKA virus NS3 protease: substrate specificity investigations**

ThPo17 *Mielczarek P., Rozmus K., Silberring J.,* **Simulation of phase II metabolism to study interactions of metabolites with proteins**

ThPo18 *Pralea I.E, Buse M., Zimţa A., Morar-Bolba G., Berindan-Neagoe I., Iuga C.A.,* **Protein Extraction from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue. A shotgun Proteomics application**

ThPo19 *Smoluch M., Mielczarek P., Kotlinska J.H., Silberring J.,* **I*n vivo* determination of the CYP2E1 expression in rat hepatic microsomes after drug administration**

ThPo20 *Sikora M., Marczak Ł., Perła-Kajan J., Jakubowski H.,* **Sex affects homocysteine modification at lysine residue 212 of albumin in mice**

ThPo21 *Kiprijanovska S., Stavridis S., Stankov O., Komina S., Petrusevska G., Davalieva K.,* **Potential urine biomarkers for prostate cancer identified by label-free nanoLC-MS/MS**

ThPo22 *Valekova I., Jarkovska K., Kotrcova E., Juhas S., Motlik J., Bucci J., Gadher S.J., Kovarova H.*, **Revelation of the IFNα, IL-10, IL-8 and IL-1β as promising biomarkers reflecting immuno-pathological mechanisms in porcine Huntington's disease model**

Friday, October 26, 2018

FrPo1 *Antolak A., Bodzon-Kulakowska A., Marszalek-Grabska M., Gibula-Bruzda E., Kotlinska J.H., Suder P.,* **Ethanol-induced alterations in ubiquitin-proteasome system**

FrPo2 *Albulescu R., Necula L.G., Neagu A.I., Dima S., Popescu I., Tănase C.,* **Evaluation of circulating angiogenic factors in hepatocellular carcinoma by proteomic technology multiplex array**

FrPo3 *Tofan V., Costache A., Țucureanu C., Onu A.,* **Expression and purification of stable uniform N^{15} labeled Shiga-like toxin 2 subunit B with application in mass spectrometry-mediated detection of hemolytic-uremic syndrome causing bacteria**

FrPo4 *Popa M.A., Mihai M.C., Constantin A., Şuică V., Costache R., Antohe F., Dubey R.K., Simionescu M.*, **Human mesenchymal stem cells migration proteins are upregulated by dihydrotestosterone treatment**

FrPo5 *Constantin A., Nemecz M., Dumitrescu M., Filippi A., Alexandru N., Smeu B., Petcu L., Georgescu A., Tanko G., C. Copaescu, Simionescu M.,* **Improved metabolic status in obese type 2 diabetic patients treated by sleeve gastrectomy is associated with increased circulating microRNA-126**

FrPo6 *Tanko G., Constantin A., Dumitrescu M., Nemecz M., Picu A., Smeu B., Guja C., Alexandru N., Georgescu A., Simionescu M.,* **Sera from obese type 2 diabetes patients undergoing metabolic surgery instead of conventional therapy exert beneficial effects on beta cell survival and function**

FrPo7 *Filippi A., Alexandru N., Voicu G., Constantinescu C.A., Rebleanu D., Fenyo M., Simionescu D., Simionescu A., Mânduțeanu I., Georgescu A.,* **Evaluation of the early and progressive changes in plasma, hemodynamic and cardiac parameters in an animal model of atherosclerosis-associated diabetes mellitus,**

FrPo8 *Butoi E., Cecoltan S., Ciortan L., Macarie R.D., Tucureanu M.M., Vadana M., Droc I., Simionescu A., Mânduțeanu I.,* **3D model to study human aortic valve disease**

FrPo9 *Iordache F., Alexandru D., Georgescu A., Airini R., Amuzescu B., Savu L., Maniu H.,* **Characterization of senescent versus early passages human amniotic fluid stem cells**

FrPo10 *Nemecz M. Tanko G., Constantin A., Dumitrescu M., Alexandru N., Fillipi A., Simionescu M., Georgescu A.,* **The mechanisms underlying protective effects of oleic acid against palmitic acid on pancreatic beta cell function**

FrPo11 *Niculescu L.S., Simionescu N., Fuior E.V., Stancu C.S., Carnuta M.G., Dulceanu M.D., Raileanu M., Dragan E., Sima A.V.,* **Inhibition of miR-486 and miR-92a decreases liver and plasma cholesterol levels by modulating lipid-related genes in hyperlipidemic hamsters**

FrPo12 *Toma L., Raileanu M., Deleanu M., Stancu C.S., Sima A.V.,* **Novel molecular mechanisms by which ginger extract reduces the inflammatory stress in TNFα – activated human endothelial cells; decrease of Ninjurin-1, TNFR1 and NADPH oxidase subunits expression**

FrPo13 *Truşcă V.G., Dumitrescu M., Fenyo I.M., Tudorache I.F., Gafencu A.V.,* **Bisphenol A down-regulates apolipoprotein A1 expression and exerts pro-atherogenic effects**

FrPo14 *Uyy E., Şuică V.I, Boteanu R.M., Ivan L., Antohe F., Simionescu M.,* **Mass Spectrometry evidence for modified protein composition of pulmonary lipid rafts in experimental diabetes**

FrPo15 *Roşca A.M., Pruna V., Tutuianu R., Neagu T.P., Lascar I., Simionescu M., Titorencu I.,* **Dermal Fibroblasts as new players in regenerative therapy**

FrPo16 *Ivan L., Uyy E., Boteanu R.M., Şuică V.I., Coman C., Berg S., Hansen R., Antohe F.,* **Exploration of mechanisms leading to plaque instability in a rabbit atherosclerotic model - preliminary data**

FrPo17 *Rebleanu D., Constantinescu C.A., Voicu G., Deleanu M., Gaidau C., Ignat M., Petica A., Călin M.,* **The effects of photocatalytic silver (Ag)-titanium dioxide (TiO2) nanoparticles on human lung epithelial cells**

FrPo18 *Constantinescu C.A., Fuior E.V., Rebleanu D., Voicu G., Deleanu M., Tucureanu M., Butoi E., Mânduțeanu I., Escriou V., Simionescu M., Călin M.,* **Downregulation of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in the aorta of APOE-deficient mice using P-selectin targeted RAGE-shRNA lipoplexes**

FrPo19 *Voicu G., Constantinescu C.A., Rebleanu D., Fuior E.V., Deleanu M., Tucureanu M., Butoi E., Mânduțeanu I., Escriou V., Simionescu M., Călin M.,* **P-selectin targeted lipoplexes carrying a shRNA plasmid to silence receptor for advanced glycation end products decrease monocyte adhesion to activated endothelial cells**

FrPo20 *Fuior E.V., Voicu G., Deleanu M., Rebleanu D., Constantinescu C.A., Safciuc F., Simionescu M., Călin M.,* **VCAM-1 targeted naringenin-loaded lipid nanoemulsions reduce monocyte adhesion to activated endothelial cells**

FrPo21 *Dumitrescu M., Truşcă V., Gafencu A., Burlacu A., Simionescu M., Askenasy N.,* **Adenoviral transduction of hepatocytes to induce Fas ligand expression**

FrPo22 *Vlad M.L., Lazar A.G., Manea S.A., Raicu M., Muresian H., Simionescu M., Manea A.***, Up-regulated NADPH oxidase-derived reactive oxygen species induce macrophage polarization towards M1 phenotype in vitro; potential implication in human atherosclerosis**

Wednesday Orals

Omics frontiers for personalized medicine

Felicia Antohe
Institute of Cellular Biology and Pathology "N. Simionescu" of Romanian Academy, Bucharest, Romania
felicia.antohe@icbp.ro

Background. The transfer of basic research data from discovery to clinical application requires smart strategies and high performant technologies. In the post genomic epoch many hopes were raised by the development of *Omics* projects with the promise to achieve personalized health care improvement, through prediction of disease risk, early diagnosis and adequate treatment. All the emerging *Omics* approaches: genomics, transcriptomics, proteomics, lipidomics, metabolomics and the recent meta-omics studies are based on the mass spectrometry key analytical technology. Thus, based on parameters as high sensitivity, mass accuracy and resolution it is possible to analyze complex probes containing a mixture of macromolecules in very small quantities operating in a global or targeted manner leading to new molecular biomarkers identification with positive impact on drug targeting and personalized therapies. Nowadays the challenge is to carefully validate the new molecular biomarkers and to thoroughly integrate all the *Omics* generated data using bioinformatics tools, to achieve a new horizon of precision medicine.

Aim. Diabetic kidney disease is the most common cause of chronic kidney disease all over the world. Novel precision medicine-based diagnostic biomarkers are desperately needed. Biochemical, histological and high performance mass spectrometry based proteomics were applied to identify potential molecular markers differentially expressed in kidney harvested from experimental diabetic mice.

Methodology. A diabetic type I experimental model was developed on double transgenic mice (dTg), Ins-HA+/-, TCR-HA+/- that were demonstrated to develop rapidly an aggressive diabetes and compared with the corresponding controls, single transgenic (sTg) Ins-HA+/-, TCR-HA-/-, and wild type (WT) mice.

Results. The preliminary results demonstrated significant ultrastructural changes in the phenotype of endothelial cells harvested from diabetic mice. The cells display a higher number of plasmalemmal vesicles and intracellular ribosomes indicating an active biosynthetic state. The LC-MS/MS bioinformatics analysis identified 1748 proteins in the detergent resistant membrane microdomains. The hiperglycemia has a regulatory consequence on the spectral abundance of alarmins, such as annexin A1, histone H4, HSPs and S100A6 and S100A9 proteins. Our novel data showed that HMGB1 presented a higher expression both at protein and gene level in diabetic animals, supporting the concept that HMGB1 is an active regulator of inflammation with significant impact on microvascular permeability.

Conclusion. Taken together the results support the concept of an inflammatory process maintained and amplified in diabetic mice, underling the associated dysfunction of microvascular endothelial cells in kidney.

Acknowledgment. The work was supported by The Romanian Academy and the Ministry of Research and Innovation UEFISCDI Grant no. 41/2018.

Solving the yellow mystery of *Papaver nudicaule* with an integrated -omics approach

B. Dudek, N. Wielsch, R.C. Menezes, A.C. Warskulat, Y. Hupfer, S. Lorenz, H. Vogel, C. Paetz, B. Schneider, A. Svatoš
Max Planck Institute for Chemical Ecology Jena
svatos@ice.mpg.de

Background. *Papaver nudicaule* is a poppy plant originating from Siberia and widely distributed in Europe as a garden flower, commonly known as Iceland poppy.
Hypothesis. The pigments of the yellow variety are called nudicaulins[1] and have a unique structure, combining structural elements from indole and flavonoids[2]. Precursor-directed biosynthetic experiments and ^{13}C labeling experiments showed that the final precursors of nudicaulins are pelargonidin glucosides and indole[3]. Their biosynthetic pathways are well known, but the complete biosynthetic pathway for nudicaulins still remains obscure.
Aim. To assess the biosynthetic pathway for nudicaulins in flowers of yellow *Papaver nudicaule*.
Methodology. Buds in different developmental stages were harvested from plants in our greenhouse. RNA, proteins and metabolites were extracted using specific protocols. Metabolomics was performed by UPLC-HRMS methods. Transcriptomics was based on NGS Illumina RNAseq. DIGE-based quantitative proteomics was performed on 2-D PAGE and proteins from spots of interest were extracted. Peptides formed by trypsinolysis were analyzed on Synapt G2Si.
Results. The most important enzymes and corresponding transcripts involved in phenylpropanoid/polyketide as well as the indole pathway were characterized. Spontaneous formation of nudicaulins needs a very acidic pH value and does not happen during developmental stage 1-3 although the precursors are present. The search for a supporting enzyme (e.g. proton pump, transporter) is still in progress.
Conclusion. The molecular base of pelargonidin glucosides and indole in yellow poppy flowers was characterized in detail, but the final condensation step to nudicaulins is still not clear.
References. 1. Price et al. *J. Chem. Soc.* (1939) 1465–1468, 2. Tatsis et al. *Org. Lett.* (2013) 15, 156–159. 3. Warskulat et al. *ChemBioChem* (2016) 17, 318–327

Exploring glucolipotoxicity in pancreatic beta cells by combining advanced confocal analysis of the subcellular lipid map with proteomics

[1]S. Sasson and [2]G. Maulucci
[1]Institute for Drug Research, Faculty of Medicine, The Hebrew University, Jerusalem, Israel
[2]Istituto di Fisica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy
shlomo.sasson@mail.huji.ac.il

Background: Pancreatic beta cells are responsible for maintaining glucose homeostasis by secreting insulin in a regulated manner in response to alterations in blood glucose levels. Metabolic stressful conditions induced by high levels of glucose and saturated fatty acids alter beta cell functions in a process termed glucolipotoxicity. The complex biosynthetic pathways of proinsulin in beta cells and its processing into mature insulin molecules, followed by their packing in secretory granules under normal and glucolipotoxic conditions, have been extensively studies. This was accompanied with proteomic analyses of human and rodent beta cells. Currently, beta cell surface proteomic analysis further identified known and unknown proteins that are implicated in the adaptive response of beta cells to acute and chronic nutritional challenges.

Hypothesis and Aims: Despite recent advances in lipidomic analysis and lipid profiling of cells less is known about the distribution and roles of structural lipids and lipid mediators in beta cells under normal and nutritional overload conditions. We hypothesized that glucolipotoxic conditions could greatly impact lipid maps of beta cells and therefore aimed at monitoring lipid turnover in live beta cells (INS-1E cell line).

Methodology: We have employed advanced confocal microscopic imaging techniques and used lipid sensitive fluorescent probes to monitor lipid turnover in these cells under normal and glucolipotoxic conditions

Results: Our results on membrane structure and organization with the fluidity sensitive probe Laurdan identified preferential effects of hyperglycemia and saturated fatty acids (*i.e.*, palmitic acid) on the fluidity of insulin granule membranes, whereas the plasma membrane was less affected. Imaging of live cells under similar experimental conditions with the solvatochromic Nile Red probe allowed for real time quantitative analysis of lipid storage and lipolysis pathways by confocal spectral imaging of intracellular micropolarity. This approach enabled real-time detection of lipid turnover, triglyceride biosynthesis and generation of lipid droplets within live beta cells exposed to nutritional stresses.

Conclusions: The complex lipid maps that are generated by these analyses add to the proteomic analyses of beta cells the potential to decipher the continuous crosstalk between lipids and protein expression and function in normal and dysfunctional beta cells.

Acknowledgments: Fondi di Ateneo, UCSC Rome, Italy; Legacy Heritage Biomedical Science Partnership of the Israel Science Foundation; Vigevani Foundation.

Challenges in Proteomics

I. Miller[1]

[1]*Institute of Medical Biochemistry, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria*

ingrid.miller@vetmeduni.ac.at

The presentation will give an overview on developments and changes in methodology in proteomic investigations over the years. Improvements will be reviewed, making the approaches more sensitive and enlarging the spectrum of detectable molecules (pI, MW, hydrophobicity). Method refinements allowed today's higher sensitivity and throughput, as well as establishing public databases which are quite complete for the more common species, but need still further improvement for others. New software tools allow interpretation of larger datasets with pathway analyses, but only for well investigated species or sample types. Gel-based and gel-free methods will be compared, also in view of future challenges. Among those are the detection and further study of so-called proteoforms or protein species, i.e. protein modifications (isoforms, PTMs, size differences), as experience from recent years has pointed out their biological importance. Other challenges still lie in sample collection, reproducibility/statistical analysis, data validation or – due to increased sensitivity – detection of biological variability even under physiological conditions (e.g. development/aging, sex). Awareness of these challenges and avoidance of potential caveats will further improve data quality and interpretation.

Thursday Orals

Biomarker discovery and validation – from shotgun proteomics to targeted methods

F. Klont[1] , S.D. Pouwels,[2] C. Güzel,[3] N.I. Govorukhina,[1] J. Hermans,[1] J.C. Wolters,[4] N.C. van de Merbel,[1,5] P.L.Horvatovich,[1] A.G.J. van der Zee, [6] N.H.T. ten Hacken,[7] T.M. Luider,[3] R. Bischoff1 [1]

[1] Department of Analytical Biochemistry, Groningen Research Institute of Pharmacy, University of Groningen, Antonius Deusinglaan 1, 9713 AV Groningen, The Netherlands

[2] Department of Pathology & Medical Biology, University Medical Center Groningen, Hanzeplein 1, 9713 GZ Groningen, The Netherlands

[3] Laboratory of Neuro-Oncology/Clinical & Cancer Proteomics, Department of Neurology, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands

[4] Laboratory of Pediatrics, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands

[5] Bioanalytical Laboratory, PRA Health Sciences, Amerikaweg 18, 9407 TK Assen, The Netherlands

[6] Department of Gynecologic Oncology, Cancer Research Center Groningen, University of Groningen, University Medical Centre Groningen, Hanzeplein 1, 9713 GZ, Groningen, The Netherlands

[7] Department of Pulmonary Diseases, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Hanzeplein 1, 9713 GZ Groningen, The Netherlands

r.p.h.bischoff@rug.nl

Background. In this keynote lecture, I will give an overview of methodological advances in the area of clinical biomarker discovery and validation. Examples will comprise the discovery of a biomarker for cervical cancer and the validation of a biomarker for chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

Hypothesis. Proteomics biomarker research is moving from the discovery stage using shotgun proteomics to targeted protein analysis methods using selected reaction monitoring (SRM) mass spectrometry in combination with liquid chromatography.

Aim. To give an overview of biomarker research starting from data-intensive shotgun proteomics analyses to validated, high-sensitivity SRM-based methods.

Methodology. Biopsies from cervical cancer patients were prepared for laser capture microdissection (LCM). Samples were obtained from cancerous tissue, healthy epithelium and stroma. Differential, shotgun proteomics analysis resulted in detection of a number of upregulated proteins in cancerous tissue. Members of the mini-chromosome maintenancecomplex (MCM) showed strong discrimination providing leads for further validation.The levels of the soluble receptor of advanced glycation end products (sRAGE) werefollowed by validated LC-MS/MS methods in the SRM mode. Serum or plasma samples wereobtained from COPD patients in relation to the stage of disease, the development ofemphysema or acute smoking history. I will describe the development and validation of three LC-MS/MS methods that allow the accurate and precise quantitation of sRAGE at the ng/mL level and relate the results to various phenotypes of COPD.

Results. The MCM-3 protein allows discrimination of cancerous tissue from healthy tissue with high specificity and sensitivity. Recent results show that MCM-3 analysis may be combined with routine screening procedures using cytological samples to reduce the number of false positives. Our work on sRAGE shows that all three LC-MS/MS methods reach the relevant concentration range of 0.1 – 0.5 ng/mL. The methods fulfill all criteria of a validated bioanalytical method according to EMA and FDA guidelines. We show that sRAGE levels

correlate with disease severity (GOLD stage) and that they are affected by acute cigarette smoke exposure prior to sample collection. Initial data indicate that sRAGE may be a valuable biomarker for emphysema development.

Conclusion. The results show that a highly discriminatory protein biomarker for cervical cancer was discovered by shotgun proteomics in extremely small samples obtained by LCM. The results show further that highly sensitivity LC-MS/MS methods can be developed and fully validated according to international regulatory guidelines.

Acknowledgments. The work was supported by the Dutch Cancer Society (project RUG2011-5021) and the Dutch Technology Foundation (program P12-04)

Factor H binding proteins of *Borrelia: immune evasion tools*

M. Bhide[1], K. Bhide[1], P. Anda[2]
[1]Laboratory of Biomedical Microbiology and Immunology, University of Veterinary medicine
[2]Institute of health, Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain
[3]Intitutte of Neuroimmunology, Slovak academy of sciences, Bratislava, Slovakia
bhidemangesh@gmail.com

Background. Factor H binding by *Borrelia* has been correlated with pathogenesis as well as with host diversity. Here we present a novel factor H binding protein, an additional member in FHBP (Factor H binding protein) family. With the help of affinity legand binding assay (ALBA), 2-D electrophoresis, peptide mass figure-printing and *de novo* sequencing we confirmed this novel, ~ 19 kDa factor H binding protein of *Borrelia garinii* serotype 4. The protein was unique in this serotype and none of the other serotypes possess this protein.

Methodology. Seventeen *Borrelia* strains were grown in BSK-II medium, washed 5 times with ultra pure water and then resuspended in water containing 1% TFA (Sigma-Aldrich), 1% of nuclease mix and 1% of a protease inhibitor cocktail (GE Healthcare). Suspended cells were sonicated on ice and protein concentration was measured by the Bradford method.

Affinity ligand binding immunoblot (ALBI) was performed to detect factor H binding proteins of *Borrelia*. Unique 19 kDa protein was separated then with 2D gel electrophoresis and subjected for peptide mass fingerprinting (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany) as per the protocol of Shevchenko. MALDI-MS data were obtained in an automated analysis loop using an Ultraflex time-of-flight (TOF) mass spectrometer (Bruker-Daltonics) equipped with a LIFT-MS/MS device. Subsequently, selected precursor ions were subject to fragment ion analysis in the tandem time-of-flight (TOF/TOF) mode to obtain the corresponding MALDI-MS/MS spectra. Automated analysis of mass data was performed using the flexAnalysis software (Bruker-Daltonics).

MASCOT peptide search was failed to assign a statistically significant peptide match with 19 kDa protein. Further manual *de novo* sequencing was attempted based on MALDI-MS/MS spectra. Peptide sequences obtained by *de novo* sequencing were submitted to the BLAST search algorithm at the NCBI (http://www.ncbi.nih-gov/BLAST/). As coiled-coil elements were demonstrated to be involved in the presentation of the fH binding sites, putative coiled-coil formation analysis for novel sequences was performed by using PepCoil software (http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/pepcoil.html).

Results. Using the ALBA, different fHBPs were observed (figure 1), however, a ~19 kDa protein of *B. garinii* serotype 4 was prominant (Lane 4) and was not observed previously by any researcher. When MALDI-MS and MALDI-MS/MS data from the ~19 kDa protein of *B. garinii* ST4 were used to search the NCBInr database, Mascot software failed to find any statistically significant protein hits; nevertheless, manual *de novo* sequencing using MS/MS fragmentation spectra from the peak showing at m/z = 2603.2 in the MALDI-MS spectrum from this sample generated the peptide sequence SNEKLEEDEENEAQQVNSLQNR. The short input BLAST search showed a complete sequence homology with a hypothetical protein of *B. garinii* PBi (Genbank AAU07257). Unfortunately, no information regarding the function and topology of hypothetical protein PBi was available in the public protein databases.

However, *in silico* analysis indicated that there was a high probability of two coiled-coil formations near the C-terminus (120 to 147 and 118 to 152 residues with a probability of 1.00), supporting the role of this novel protein in human fH binding.

Conclusion. The role of factor H binding proteins of *Borrelia* in immune evasion is emmense. We identified novel factor H binding proteins of *Borrelia* species.

Acknowledgments. Acknowledgements: This work was supported by APVV-14-0218 and VEGA 1/0258/15

The Pitchfork Strategy. A multi-pronged approach for membrane proteome profiling

O. Vit [1], K. Pacak [2], J. Petrak [1]
[1]BIOCEV, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic
[2]National Institutes of Child Health and Human Development (NICHD), Bethesda, Maryland, USA
jpetr@lf1.cuni.cz

Background and Aims. Roughly a quarter of human genes encode integral membrane proteins (IMPs). Their specific functions and localizations make IMPs attractive drug targets. However, their amphipathy, lack of trypsin cleavage sites and their relatively low expression levels complicate proteomic analyses of IMPs. Pheochromocytoma and paraganglioma (PHEO & PGL) are rare neuroendocrine tumors. Our goal is to gather data for a detailed description of membrane proteome of human PHEO & PGL that could help identify new drug targets and diagnostic markers.

Methodology. Among the most effective approaches for proteomic analysis of low-abundant IMPs are "divide and conquer" methods that selectively target either soluble (extra-membrane) or hydrophobic (transmembrane) segments of IMPs. In order to maximize the membrane proteome coverage, we combined both of these two strategies with a standard detergent-based tryptic digest into a multi-pronged "Pitchfork strategy". Specifically, we employed two well-established methods of glycopeptide enrichment (lectin-FASP and SPEG) along with our recently introduced hPTC method (high pH, trypsin, CNBr) which allows identification of IMPs based on their hydrophobic alpha-helices.

Results and conclusions. We apply the "Pitchfork startegy" to the membrane proteome profiling of human pheochromocytoma and paraganglioma (PHEO & PGL) samples. The Pitchfork strategy targets different features of IMPs and allows us to identify broader range of IMPs than the classical proteomic strategies. On average, we identify 800-1300 IMPs in each patient sample. It represents nearly 2000 unique IMPs in all PHEO & PGL samples analyzed to date. Among the identified proteins, we routinely observe numerous so-called "missing proteins".

Acknowledgments. The work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Inter-Action LTA USA 17148, PROGRESS Q26, NPU II. –LQ1604 and UNCE/MED/016).

Efficient coverage analysis for HCP ELISA assay validation

L. Keller
Application Specialist GE Healthcare Life Sciences

The most widely used method to monitor the HCP levels in biologics is Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), which uses a set of polyclonal antibodies to detect HCPs as many as possible. These anti-HCP antibodies are critical reagents in the assay. The antibody coverage assay based on 2 Dimensional Electrophoresis (2DE) and subsequent Western Blot (WB) has been used to evaluate the performance of the anti-HCP antibodies. The result will be expressed as a % coverage of the antibodies to the total number of HCP spots separated by the 2DE (USP <1132> and Ph Eur 2.6.34).
The challenges in the coverage assay are:

1. Sensitive method to detect HCPs as much as possible
2. High resolution to separate the complex mixture of HCPs
3. Reliable comparison between total HCP & WB detection
4. Time consuming in both experimental preparation and output data analysis

We propose an enhanced anti-HCP antibody coverage analysis method, 2D Differential In Blot Electrophoresis (2D-DIBE). The solution is a fluorescent multiplexed methodology, based on proven 2D-DIGE & WB technologies which enable simultaneous detection of total HCP & WB with image acquisition hardware and analysis software. In this presentation we focus on the technical aspect of 2D-DIGE and DIBE technology and how these solve the current challenges of the coverage assay.

Wide and Deep: New Reagents and Workflows for Multiplexed Quantification and Targeted Analysis

C. Dauly[1], R. Viner[2], S. Gallien[1], A. Huhmer[2], J. Rogers[2], M. Oppermann[3]
Thermo Fisher Scientific [1]France, [2]USA, [3]Sweden

Analytical depth and quantitative precision are fundamental requirements in proteomics. Herewith we present methodologies and data supporting multiplexed approaches for proteome untargeted and targeted analysis.

Quantitative proteomics strategies using Tandem Mass Tag™ (TMT™) reagents enable sample multiplexing and precise measurement of protein abundance. However, successful execution of this workflow includes multiple steps that may require optimization including chromatography, mass spectrometry and data analysis. Therefore to be able to detect and diagnose co-isolation interference, enable MS method optimization and validation, we developed a yeast triple gene knockout (TKO) TMT11plex labeled peptide reference standard. The standard provides users a tool to measure the accuracy, precision and dynamic range of different mass spectrometry approaches, while also functioning as an excellent quality control assessment of the analytical platform performance.

Targeted proteomics analyses based on HRAM parallel reaction monitoring (PRM) measurements have delivered a significant increase in selectivity of measurements, allowing more sensitive endogenous peptide quantification in complex samples. Refined acquisition methods, such as dynamic retention time PRM (dRT-PRM), have enabled larger-scale experiments while still providing exquisite data quality. A new workflow was developed using PRM in combination with Multiplex Immunoprecipitation (mIP) and fast capillary-flow LC separation to perform high throughput monitoring of the mTOR/AKT signaling pathway.

Molecular identification of nitro-tyrosine modification in human eosinophil proteins by proteolytic affinity extraction-mass spectrometry (PROFINEX)

B.A. Petre[1,2,4], L. Ion[1,2], M. Ulrich[3], G. Doering[3],M. Przybylski[2]
[1]*Faculty of Chemistry, Alexandru Ioan Cuza, University of Iaşi, Romania*
[2]*Department of Chemistry, Analytical Chemistry, University of Konstanz, Germany*
[3]*Institut für Allgemeine Hygiene, University of Tübingen, Germany*
[4]*TRANSCEND Center at Regional Institute of Oncology, Iaşi, Romania*
brindusa.petre@uaic.ro

Background. Tyrosine nitration is a posttranslational modification in proteins which may occur under physiological-conditions, but may be substantially enhanced in diseases associated with oxidative stress. The identification of 3-nitrotyrosine (3NT) residues is important for studies of *in vivo* mechanisms, and the characterization of functional consequences of nitration.

Hypothesis. While immuno-analytical methods suffer from low detection specificity of antibodies, mass spectrometric methods for identification of 3-NT are frequently hampered by low levels of modification, and by possible structural changes introduced by the nitration.

Aim. In this work, antibodies against 3NT have been employed in a new proteolytic affinity-mass spectrometry approach ("PROFINEX") for the direct, molecular identification of nitration sites in eosinophil proteins.

Methodology. Eosinophil proteins were isolated from patients with elevated eosinophils in blood due to chronic bacterial lung infection. For "PROFINEX"-MS approach a sepharose immobilized 3NT antibody column was prepared. The Eosinophil cationic protein and Eosinophil-derived neurotoxin were digested in solution, and the digestion mixtures applied on the affinity column. After 2 hrs incubation, several washing steps were performed to remove non-binding fragments, and then the bound peptides eluted and analyzed by nanoESI-FTICR- MS. In order to estimate the level of nitrated protein, the elution fraction was also subjected to Edman microsequencing.

Results. For ECP protein, the nano-ESI-FTICR mass spectrum of the elution fraction yielded a major doubly protonated molecular ion corresponding to the ECP: 23 - 34 peptide, nitrated at Tyr-33. The elution fragment was analyzed by nano-ESI-FTICR-MS providing most abundant multiply protonated molecular ions of EDN: 29 - 43, nitrated at Tyr-33. Using an additional "PROFINEX" experiment, the elution fraction was subjected to Edman microsequencing which showed a modification yield of approximately 10 % of Tyr-nitrated eosinophil proteins.

Conclusion. The PROFINEX-mass spectrometry approach is a high specific and sensitive tool for the molecular identification of Tyrosine nitration in proteins.

Acknowledgments. The work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft, Germany (PR-175 14/1), the European Union (IRSES-269256; "MSLife"), and the Romanian National Authority for Scientific Research, CNCS– UEFISCDI, projects PN-II-RU-E-2011-3-0038 and PN-II-RU-TE-2014-4-0920.

Synergistic success of proteo-genomics in interrogating exotic biological fluids using a novel high sensitivity Immunoassay

N. Turck[1], M. Dor[1], E. Kishazi[1], T. Sebata[2] D. Bourdon[2], S.J. Gadher[2]
[1]Faculté de médecine, Département de science des protéines humaines, CH - 1211 Genève 4
[2]Thermo Fisher Scientific, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008 USA.

Keywords: ProQuantum™ Immunoassay, *antibodies, biological fluids*, biomarkers, tears

Quest for key biomarker(s) for diseases has become one of the biggest challenges of today and proteomics alone is not able to provide the answers as it does not have the luxury of amplification of the miniscule quantities that may be present in the biological fluid. Additionally, researchers are turning to exotic human biological fluids for specific indications and further interrogation of an organ or its biological fluid. One such example is the human eye and the tears with their comprehensive biomolecule repertoire which serve as a good source for biomarkers and offer an excellent opportunity for patient stratification in precision medicine. Tear collection is fast, noninvasive and offers a chance to determine ocular well as systemic diseases in patients.

Clinicians and translational research scientists studying the multifaceted etiology of various diseases require powerful investigational tools for targeted interrogation of gene activation, cellular interactions, receptor-mediated effects and intracellular signaling processes. Additionally, 'Proteo-genomics', or the integration of proteomics with genomics and encompassing transcriptomics, is a novel approach that promises to advance translational and clinical research. To this end, **ProQuantum™ High Sensitivity Immunoassay technology** incorporating analyte specificity of high affinity antibody-antigen binding with the signal detection and amplification of real-time PCR, offers a flexible and scalable assay platform enabling a multidimensional analyses of DNA, RNA, and now proteins. ProQuantum™ technology offers a greater sensitivity, better dynamic range than traditional methods, smaller sample consumption (1-2 μL per sample), a faster, simplified workflow and robust data analysis software. It is foreseeable that such a technology will have an integral role in clinical studies for establishing biomarker profiles of various disease status.

The Next Generation of IMS Research Platform

M.A.Kennedy[1], E.Marsden-Edwards[2], J.Langridge[2], J.Ujma[2], K.Giles[2], J.Wildgoose[2], K.Richardson[2], D.Hewitt[2], M.Palmer[2]

[1]Waters Corporation, Stamford Avenue

Wilmslow, United Kingdom

[2]Advanced Mass Spectrometry Technologies, Waters Corporation, United Kingdom

Matt_kennedy@Waters.com

Background. The Advanced MS Technologies (AMST) is a small group within Waters Global Products, formed in 2017 to develop research products directly with pioneering research groups.

Hypothesis. The Advanced MS Technologies team is dedicated to delivering customer benefit in the research market segment through the rapid evaluation, development and deployment of innovative MS capabilities.

Aim. To develop scientifically relevant research platforms utilising advanced technology

Methodology.The AMST team currently comprises 20 multifunctional specialists which is continually being expanded.

Results. An advanced ion mobility enabled research platform has been developed and applied to numerous application areas. The system will be delivered to collaboration partners in 2019.

Conclusion. The preliminary results illustrate the benefits of high resolution (>500) ion mobility as well as the benefits of the unique acquisition modes the unique geometry fascilitates.

Acknowledgments. This presentation was compiled with the assistance of the AMST Group & Financial Support from Waters Corporation.

Identification of Antibodies by integration of mass spectrometry and DNA sequencing

T.M. Luider
Laboratory of Neuro-Oncology/ Clinical and Cancer Proteomics, Dept. Neurology, Erasmus M, Rotterdam, the Netherlands

Background. Mass spectrometry and whole genome sequencing give the possibility to identify antibodies specific for cancer by integration of techniques.
Hypothesis. By high resolution mass spectrometry and whole genome sequencing of antibody sequences it is possible to find antibodies specific for cancer.
Aim. To identify antibodies that correspond to multiple myeloma (Zajec et al., 17, 1326, 2018; J. Prot. Res.) and paraneoplastic syndrome (HuD) (VanDuijn et al., 8, 1286, 2017; Frontiers in Immunology).
Methodology. We developed a multi-omics technique to identify antibodies that can be used for detection of multiple myeloma during minimal residual disease.
Results. Proteotypic M-protein peptides as well as unique peptides derived from therapeutic monoclonal antibodies were targeted in serum of patients with multiple myeloma. We address the sensitivity in M-protein diagnostics and show that our mass-spectrometry assay is more than two orders of magnitude more sensitive than conventional M-protein diagnostics. The use of stable isotope-labeled peptides allows absolute quantification of the M-protein and increases the potential of assay standardization.
In another eexample the combination of NGS and proteomics analysis show that immune responses result in antibody sequence fragments that can be shared among subjects exposed to the same immunogen. NGS data provide a much deeper view on the immune repertoire, as well as an improved sequence accuracy. The proteomics data, however, still allows us to focus on an antigen-specific subset of immunoglobulin sequences in serum. This gives possibilities for diagnostics as well as potential therapeutic applications.
Conclusion. A simple (proteomics) assay for the presence of such an amino acid sequence could function as a proxy for a variety of immunological conditions, such as response to disease (multiple myeloma), vaccination, pathogen infection, auto-immune disease, or a response against tumor-associated antigens.

Acknowledgement: The authors of Zajec et al. 2018 and Van Duijn et al. 2017 are acknowledged for the inspiring collaboration to accomplish this translational research work.

Cytokine profiling in melanoma patient serum for monitoring of cancer progression

H.K. Skalnikova[1], J. Kucera[2,3], K. Strnadova[2,4], O. Kodet[2,3,4], B. Dvorankova[2,4], L. Lacina[2,3,4], I. Krajsova[2,3], J. Stork[2,3], P. Szabo[2,4], P. Dundr[2], K. Smetana, Jr.[2,4], H. Kovarova[1], P.Vodicka[1]

[1]*Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Libechov, Czech Republic*

[2]*Charles University, 1st Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic*

[3]*General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic*

[4]*Charles University, 1st Faculty of Medicine, BIOCEV, Vestec, Czech Republic*

skalnikova@iapg.cas.cz

Background. Malignant melanoma is a skin cancer with permanently increasing incidence and unfavourable prognosis in advanced stages. Interestingly, partial spontaneous regression has been observed in up to 50% of melanoma lesions suggesting a significant role of immune system in melanoma control.

Hypothesis. Cytokines are key factors regulating immune response and intercellular communication in tumour microenvironment. Blood serum cytokines may reflect the response of immune system to melanoma.

Aim. Proteomic profiling of cytokine levels in melanoma patient blood serum and identification of cytokines reflecting melanoma stage and generalization.

Methodology. Levels of 31 cytokines, chemokines and growth factors in blood serum of malignant melanoma patients and controls have been analysed using the Human Cytokine Magnetic 30-Plex Panel and CXCL1 Human ProcartaPlex™ Luminex xMAP® bead assays. Relation between levels of studied factors and Breslow index, generalization of tumours and clinical stage was evaluated. Expression of selected cytokines and their receptors in tumour sections, cultured malignant and stromal cells was evaluated by immunochemistry.

Results. Growth factors HGF, G-CSF and VEGFA, chemokines RANTES and IL-8 and cytokines IL-6, IFNα, IFNγ, and IL-1RA were discovered to reflect melanoma clinical stage and generalization. Both cancer cells and stromal elements participate in the production of such proteins.

Conclusion. This study demonstrates that malignant melanoma formation and generalization is reflected in serum samples. Secreted factors identified in this study are able to influence the tumour growth, its metastasising and anticancer activity of immune system.

Acknowledgments. The work was supported by Czech Science Foundation (project no. 16-05534S) and National Sustainability Programme I of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project no. LO1609).

Proteomic approaches for the evaluation of natural products in cancer prevention and therapy

C. Tănase[1,2], *E. Codrici*[1], *S. Mihai*[1], *I.D. Popescu*[1], *L. Albulescu*[1], *L.G. Necula*[1,3], *A.M. Enciu*[1,4], *R. Albulescu*[1,5]

[1]*Victor Babeș National Institute of Pathology, Biochemistry-Proteomics Department, Bucharest, Romania;*

[2]*Titu Maiorescu University, Bucharest, Romania;*

[3] *St. S. Nicolau Institute of Virology, Bucharest, Romania;*

[4]*Carol Davila University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Romania;*

[5] *National Institute for Chemical Pharmaceutical R&D, Bucharest, Romania*

bioch@vbabes.ro

Background. Research into natural products has experienced a certain resurgence recently. One reason for this interest is due to the growing evidence supporting the potential application of natural products as agents for cancer prevention and treatment.

Hypothesis. Natural products can regulate cellular signalling pathways, as well as down-regulate the expression of oncogenic miRNAs and up-regulate the expression of tumour suppressive miRNAs.

Results. By modulating these key processes, natural products can inhibit cancer cell growth and cancer stem cell (CSC) renewal, therefore deterring tumour progression and development. Furthermore, by targeting and inhibiting CSC, natural products could prevent the emergence of drug-resistant tumours. However, additional *in vitro* and *in vivo* studies and clinical trials are required to achieve the true value of natural products for the prevention and/or treatment of cancer.

Acknowledgement: Partially supported by the grant COP A 1.2.3., ID: P_40_197/2016, Ctr. 52/2016 and PN 18.21.01.06.

Unleashing the power of QTOF technology for proteomics with TIMS and PASEF

H. Koch[1], P.O. Schmit[2], S. Koch[1], M. Macht[1], M. Lubeck[1], O. Raether[1],
[1]Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany
[2]Bruker Daltonique, France
martina.macht@bruker.com

Background. In data dependent acquisition experiments only around 20% of the eluting peptide features are targeted for MS/MS due to limitations in speed, sensitivity and resolution. Recently a novel approach was described, parallel accumulation – serial fragmentation (PASEF), that is able to increase the sequencing speed and sensitivity of MS/MS scans on a TIMS-QTOF setup significantly (Meier et al., JPR 2015, PMID: 26538118 and Meier et al. 2018, bioRxiv, submitted).

Hypothesis. Use of PASEF-TIMS-QTOF-MS/MS in shotgun proteomics experiments should lead to improved number of protein identifications combined with excellent reproducibility for quantification in whole proteome experiments.

Aim. Reducing the required sample amount and increasing the acquisition speed to improve the results in clinical studies.

Methodology. In a TIMS-QTOF instrument ions are accumulated for a user-defined time and released from the TIMS device depending on their mobility cross section. By applying the PASEF method multiple precursors per TIMS scan were selected by sub-millisecond switching of the quadrupole isolation window. Raw data were analyzed using DataAnalysis (Bruker Daltonics) and MaxQuant (MPI of Biochemistry). Different accumulation and release times (25-100 ms) corresponding to median ion mobility resolutions of up 78 were tested. The sensitivity was improved by targeting low abundant precursor ions several times.

Runtimes of only 5.6 min were performed by connecting with a novel nanoLC separation technology (Evosep, Odense, Denmark).

Results. As a reference test for the benefit of the high speed and sensitivity of PASEF, just 100 ng of a human cancer cell line (HeLa) protein digest were analyzed in a 90 min nanoLC gradient. From this run almost 40.000 peptides were identified resulting in more than 5000 protein identifications. With only 3 ng of HeLa digest still around. 1700 proteins could be detected.

Application of PASEF allows the selection of 12 precursors within 100 ms release time: this corresponds to approx. 120 MS/MS spectra per second and demonstrates the fast targeting of peptide features. With a novel nanoLC separation technology (Evosep) extremely short runtimes of only 5.6 min were performed, still resulting in the identification of 1400 proteins reproducibly.

Conclusion. The use of a dual Trapped Ion Mobility Spectrometry (TIMS) analyzer in a last generation UHR-QTOF architecture allows to reach MS/MS sequencing speed exceeding 100 Hz while improving the overall sensitivity and maintaining an ultra-high resolution at all MS/MS speed. Due to TIMS separation, the global peak capacity and hence selectivity of the system is also increased.

The low sample amount of the approach opens the method to real clinical applications with biopsies or laser-dissected material. Analysis after cell sorting and even single cell analysis are in reach.
This speed as well is suitable for the analysis of large sample cohorts, like in clinical studies.

Selection of Collision Energies in Tandem Mass Spectrometry Based Proteomics

Á. Révész[1], T.A. Rokob[2], D.J. Dit Fouque[3], L. Turiák[1], A.Memboeuf[3], K. Vékey[1], László Drahos[1]

[1]MS Proteomics Research Group, Research Centre for Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, Magyar Tudósok körútja 2, H-1117 Budapest, Hungary

[2]Theoretical Chemistry Research Group, Research Centre for Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, Magyar Tudósok körútja 2, H-1117 Budapest, Hungary

[3]UMR CNRS 6521, CEMCA, Université de Bretagne Occidentale, 6 Av. Le Gorgeu, 29238 Brest Cedex 3, France

drahos.laszlo@ttk.mta.hu

Background. The collision energy is the most important single parameter influencing the success of MS/MS-based peptide identification. In the present work we will study the energy dependence of peptide identification scores and determine the optimal collision energy.

Hypothesis. We believe that the collision energy in most proteomics experiments is not ideal. Conventional approaches to optimize the collision energy seem to be inadequate.

Aim. Our aim is to establish new criteria for optimizing the collision energy, and map the influence of collision energy on peptide identification and on sequence coverage.

Methodology. Tryptic digests of complex standards (*HeLa, E. Coli*) were subject to nano-HPLC-MS/MS experiments at various collision energies on a Bruker Maxis II ETD QTOF instrument. Spectra were matched against the SwissProt database using the Mascot search engine. MASCOT score vs collision energy curves were compiled and fitted using an in-house developed software.

Results. Cluster analysis of Mascot score vs. energy curves revealed two different curve shapes; one characterized by one maximum, the other by two separate maxima (unimodal and bimodal curves). For improved accuracy, optimum collision energy was determined by approximating the curve shape by one or two Gaussian curves. The lower energy maxima can be associated with the highest abundance of b ions, while the higher energy maxima are related to the optimum for y ions in the MS/MS spectra.

Conclusion. An unprecedented bimodal behavior of the score vs. energy curves, linked to the different behavior of y- and b-type ions, was identified for about half of the peptides. For these, collision energy optimization can increase the average score by ~15%, improving both sequence coverage, peptide identification scores and protein identification.

Acknowledgments. The work was supported by National Research, Development and Innovation Office (NKFIH K-109006). Á.R. and L.T. were supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences.

References. Revesz A., Rokob T. A., Jeanne Dit Fouque D., Turiak L., Memboeuf A., Vekey K., Drahos L., J. Proteome Res., 17, 1898-1906 (2018)

Characterising Extracellular Vesicles with Nanoparticle Tracking Analysis

Y.S. Chen, P. Carnell-Morris, T. Dennison
Malvern Panalytical, Enigma Business Park Grovewood Road, Malvern, WR14 1XZ, United Kingdom
tom.dennison@malvernpanalytical.com

The study of Extracellular Vesicles (EVs) has attracted significant amount of interest over the past few years. EVs from different sources may be useful biomarkers for a range of different diseases such as pre-eclampsia and cancer.

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) is a valuable technology within the field of EVs research, providing both high resolution size data and a number concentration. There is a growing interest in using fluorescence labelling to gain a better insight into the samples (F-NTA). F-NTA has been successfully employed to identify the presence of membrane containing particles which provides confidence in the purity of the sample. The use of antibodies and Quantum Dots allowed EVs exhibiting specific epitopes to be measured. Using this approach EVs of interest were able to be characterised from the total population. This presentation will cover the principles of NTA and how it can be used in the characterisation of EVs. We will also discuss how NTA can be used conjunction with other particle sizing technology to provide a comprehensive and powerful measurement suite.

Malvern Panalytical is a leading provider of scientific instrumentation for the measurement of elemental concentrations, crystallographic structure, molecular structure, remote sensing, rheology, particle size, particle shape, particle concentration and more.

Targeted nanocarriers to ameliorate vascular inflammation

M. Călin, D. Rebleanu, C.A. Constantinescu, G. Voicu, E. Fuior, I. Mânduțeanu, M. Simionescu

Institute of Cellular Biology and Pathology "N. Simionescu" of Romanian Academy, Bucharest, Romania

manuela.calin@icbp.ro

Background. Inflammation is a common process associated with numerous vascular pathologies. Cell adhesion molecules (CAM), such as VCAM-1 and P-selectin, that are specifically expressed by activated endothelial cells (EC) are promising targets for nanotherapeutic intervention.

Hypothesis. Targeting the inflamed endothelium by coupling peptides with high affinity for CAM to the surface of nanocarriers entrapping anti-inflammatory agents will highly increase their specific binding to activated EC and reduce the cell activation.

Aim. Development of suitable nanocarriers to perform specific and effective delivery of therapeutic agents to dysfunctional EC.

Methodology. We developed and characterized lipid-based nanoparticles directed towards CAM and used them as vectors for specific delivery of small molecule drugs (such as dexamethasone, chemokine receptors antagonists) or small interfering (si) RNA and monitored their anti-inflammatory effects *in vitro* using cultured endothelial cells and *in vivo* using mouse models.

Results. Nanocarriers directed to CAM bind specifically to activated endothelium and are functional in delivering anti-inflammatory compounds to EC, reducing the expression of proinflammatory genes and preventing the monocyte adhesion and transmigration to/through activated EC.

Conclusion. Nanocarriers which transport anti-inflammatory drugs at specific pathological sites in the vasculature are efficient in reducing the inflammatory processes.

Acknowledgments. The work was supported by the following projects: nr. 4-001 (NANODIATER, under the ERA-NET scheme of European Commission), nr. 13PCCDI/ 2018 (INTERA), PN II-RU-TE-2014-4-1837 (NANORAGE), Competitiveness Operational Programme 2014-2020, Priority Axis1/Action 1.1.4, Financing Contract no.115/13.09.2016/ MySMIS:104362 (THERAVALDIS).

Background Proteins in Human Chorionic Gonadotropin Pharmaceutical Formulations of Different Origin

T. Panić-Janković[1]

[1]*Clinical Institute of Laboratory Medicine, Medical University of Vienna, Vienna, Austria*

tanja.panic@meduniwien.ac.at

Background. Gonadotrophins, including Human chorionic gonadotrophin (hCG), have been used since and for several decades to treat infertility by ovarian stimulation. The hCG is being extracted from urine of pregnant women and it does inevitably contains other proteins secreted into urine. The presence of other proteins varies from batch to batch and it can be significantly high

Hypothesis. Current study investigated the presence of proteins other than hCG in different batches of commercial formulations produced by extraction from urine and by using the recombinant approach. The total protein content varied from batch to batch and a large number of contaminant urinary proteins were identified in all analyzed samples except for the recombinant product.

Aim. Identifying proteins other than hCG in formulations used for in-vitro fertilization (IVF) treatment.

Methodology. The nano HPLC system used in all experiments was an UltiMate nanoRSLC 3000 HPLC system (Thermo Fisher, Germering, Germany), coupled to an QExactive Plus mass spectrometer (Thermo Fisher, Bremen, Germany). Separation column: µPAC™ column, 200cm length, with pillar array backbone at interpillar distance of 2.5µm, C18 (Pharma Fluidics, Zwijnaarde, Belgium), trapping column (trap column) was a PepMap C18; 100 Å pore size; 5 µm particle size; 0.3 mm ID x 5 mm length (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). Database search was performed using Mascot and the SwissProt Protein database.

Results. For all samples analyzed, active substances were identified as major compounds. However, a number of other proteins were also identified in all samples. The majority of identified proteins were urinary proteins that were not removed during the process of hCG extraction from the raw material.

Conclusion. Products originating from the production process employing recombinant method have significantly less contaminant proteins of human origin than those produced from urine.

Acknowledgments. The work was supported by EU FP7 project Prot-HiSPRA, No. 282506

Proteomic alterations induced by poly (2-ethyl butyl cyanoacrylate) nanoparticles

V.I.Şuică[1], E.Uyy[1], L.Ivan[1], R.M.Boteanu[1], R.Hansen[2], Y.Mørch[3], F.Antohe[1]

[1]Institute of Cellular Biology and Pathology "N. Simionescu" of Romanian Academy, Bucharest, Romania

[2]SINTEF Technology and Society, Trondheim, Norway

[3]SINTEF Materials and Chemistry, Trondheim, Norway

viorel.suica@icbp.ro

Background. Microbubbles are well-established contrast agents in bio-medical area, but current formulations are fragile, exhibit a short blood circulation time and have limited targeting capabilities.

Hypothesis. Novel nanoparticle-based microbubbles have been proposed to overcome these limitations. These can both target biomarkers and are drug-loaded, with multimodal imaging properties, improving thus the current state of diagnosis and therapy of atherosclerosis or cancer.

Aim. To assess the action of poly (2-ethyl butyl cyanoacrylate) nanoparticles (NP) on the proteomes of different cell lines and murine hepatic tissue.

Methodology. Cultured EAhy926 human endothelial, RAW 264.7 murine macrophages and BxPC-3 pancreatic adenocarcinoma cells were incubated for 2 h in the absence or presence of 20 μg/ml NP. The cells were solubilized and suitably processed for mass spectrometric (MS) analysis using the EASY–nLC II - LTQ Orbitrap Velos PRO MS (Thermo Scientific). C57Bl mice were injected retro-orbitally with 40.8mg/kg body NP containing modified Nile Red fluorophore and subjected to the IVIS Spectrum *in vivo* Imaging System (Perkin Elmer). MS analysis was also performed on hepatic tissue harvested 6 hours post injection.

Results. Protein inference, label-free relative quantification and data mining proteomic *in vitro* analysis revealed the significant over-representation of spliceosome, ribosome, and protein processing in endoplasmic reticulum signaling pathways. The *in vivo* fluorescence detection revealed a maximum intensity of the signal in the liver at 6h post-injection. Also, the hepatic proteomic profile demonstrated a spectral abundance alteration of proteins implicated in response to stimulus, regulation of biological processes and metabolic processes.

Conclusion. The results suggest an altered protein biosynthetic machinery of cells exposed to NP, while the *in vivo* imaging experiments demonstrated a temporal bio-distribution and clearance of NP. Also, protein pre- and post-adsorption studies revealed the importance of NP protein corona composition for their *in vitro* and *in vivo* dynamic action.

Acknowledgments. The work was supported by The Romanian Academy and the Ministry of Research and Innovation UEFISCDI Grant no. 41/2018.

Friday Orals

One carbon metabolism and protein methylation. Implications in liver diseases

F.J. Corrales[1], V. Ambao[2], M.I. Mora[3], E. Bigaud[3], B. Sangro[3], I. Granero[4], A. Paradela[4]

[1]Centro Nacional de Biotecnología, CSIC; CIBEREHD, Madrid, Spain; [2]Centro de Investigaciones Endocrinológicas CONICET, Buenos Aires, Argentina; [3]Clínica Universidad de Navarra-IDISNA and CIBEREHD, Pamplona, Spain; [4]Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid, Spain

fcorrales@cnb.csic.es

Background. Primary liver cancer (HCC) is recognized as the fifth most common neoplasm and the second leading cause of cancer death worldwide. Although most risk factors are known, and the molecular pathogenesis has been widely studied the underlying molecular mechanisms remain to be unveiled. This is a central issue to facilitate the definition of novel biomarkers and clinical targets for more effective patient management.

Hypothesis. One carbón metabolism (1CM) is central for the maintenance of differentiated hepatocytes as it is considered the connection between intermediate metabolism and epigenetic regulation.

Aim. To assess the role of 1CM impairment in liver disorders and HCC and to investigate the underlying mechanisms.

Methodology. iTRAQ isobaric labeling was used to investigate the differential proteome associated to a methylthioadenosine phosphorylase deficiency (MTAP, SkHep1 cells). Differential methylproteome was studied by R-methyl peptide enrichment followed by LC-MS/MS analysis; measurements were done in a 5600 triple TOF. Targeted SRM assays were designed for 12 1CM enzymes; measurements were don in a 5500 QTRAP; data analysis was done with Skyline.

Results. iTRAQ analysis of SkHep1 deficient and non-deficient cells resulted in the identification of 216 differential proteins ($p<0.05$) that suggest deregulation of cellular pathways as those mediated by ERK or NFκB. R-methyl proteome analysis lead to the identification of 74 differentially methylated, including 116 new methylation sites. Inhibition of RNA binding proteins methylation is especially relevant upon accumulation of MTA in MTAP deficient cells. The phenotype associated with a MTAP deficiency was further verified in the liver of MTAP+/- mice. Measurement of MAT1A, MAT2A, MAT2B, GNMT, SAHH, CBS, CGL, BHMT, CHDH, MTAP, SHMT and DYR by SRM revealed a tissue specific expression profile. Pathway remodelling was detected in the liver of mice fed with high fat and choline and methionine deficient diets, upon CCl4 induced liver injury and in liver tumours.

Conclusion. In light of our data, it is tempting to suggest that the lack of MTAP is a bad prognostic hallmark in cancer. The systematic monitorization of one carbon metabolism in the liver may probe its usefulness for the assessment of liver parenchymal cells homeostasis.

Acknowledgments. This work was supported by SAF2014-5478-R from Ministerio de Economía y Competitividad. The Proteomics Unit belongs to ProteoRed, PRB2-ISCIII, supported by grant PT13/0001L, and PRB3-ISCIII supported by grant PT17/0019.

Micro-Pillar-Arrayed Column (µPAC) for Proteomics

G. Mitulović[1]

[1]*Proteomics Core Facility and Clinical Institute of Laboratory Medicine, Medical University of Vienna, Vienna, Austria*

goran.mitulovic@meduniwien.ac.at

Background. Recently, a new type of commercially available separation columns manufactured from a silica wafer using lithographic micromachining techniques. According to the manufacturer: "The lay-out of the stationary phase support structure is carefully designed. The perfectly ordered backbone of the separation bed is formed by etching interstitial volumes out of a silicon wafer".

Hypothesis. As opposed to conventionally packed separation columns, the micro Pillar Array Column (PAC) is being produced using micromachining of designed chromatographic beds into silicon. The use of this manufacturing approach enables an almost perfect order of the pillars as opposed to packed columns where the column packing never can be perfect.

Aim. Increasing the peak capacity of the separation system and improving the number of protein identifications.

Methodology. The nano HPLC system used in all experiments was an UltiMate nanoRSLC 3000 HPLC system (Thermo Fisher, Germering, Germany), coupled to an QExactive Plus mass spectrometer (Thermo Fisher, Bremen, Germany). Separation column: µPAC™ column, 200cm length, with pillar array backbone at interpillar distance of 2.5µm, C18 (Pharma Fluidics, Zwijnaarde, Belgium). PepMap C18 nano separation column (75µmID x 50 cm length, 3µm particle size, 100Å pore size, ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) and the trapping column (trap column) was a PepMap C18; 100 Å pore size; 5 µm particle size; 0.3 mm ID x 5 mm length (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany).

Results. Highly reproducible separation of tryptic peptides was achieved at higher flow rates but significantly lower pressure as compared to packed columns. The number of identified proteins is comparable to the 75 µm x 50 cm nano column and surpasses it. The overall system's stability is higher in terms of reproducible retention times and stable column pressure.

Conclusion. The results show that µPACs can be successfully applied for analysis of proteomic samples.

Acknowledgments. The work was supported by Austrian Agency for International Cooperation in Education and Research within the project "Danube meets omics" MULT_DR 07/2017

Branched-chain and aromatic amino acids in diabetes-application of metabolomics in clinical settings

C. Bala[1], *A. Rusu*[1], *D.M. Ciobanu*[1], *A.E. Craciun*[1], *G. Roman*[1]

[1]*Department of Diabetes and Nutrition, Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania*

cbala@umfcluj.ro

Background. The metabolome is the terminal downstream product of the genome and consists of the total complement of all metabolites in a biological specimen. Branched chain amino acids (BCAA): leucine, isoleucine, valine and Aromatic amino acids (AA): phenylalanine, tryptophan, tyrosine, histidine were shown to be associated with insulin-resistance in pre-diabetes and to decrease following treatment with insulin-sparing agents or bariatric surgery in patients with type 2 diabetes (T2D).

Hypothesis. In patients with long-standing T2D already treated with insulin, BCAA and AA could be associated with higher insulin requirements due to higher insulin-resistance.

Aim. To compare the concentration of BCAA and AA between tertiles of insulin dose/kg body weight and to establish possible correlations between BCAA and AA and clinical parameters in a group of patients with insulin-treated T2D.

Methodology. Patients with T2D treated with insulin for >6 months and with stable insulin doses (±10%) within 3 months before inclusion were enrolled in this study. Medical history and routine biochemical parameters including C-peptide were collected for each patient. Concentrations of BCAA and AA were measured in fasting conditions by advanced technique ultra-high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry UHPLC-QTOF-(ESI+)-MS.

Results. The study group consisted of 80 patients with insulin-treated T2D, of whom 58.8% were women, mean age 63.8±9.0 years and diabetes duration 12.9±7.0 years, median C-peptide 0.3 ng/ml. No correlations were found between individual concentrations of BCAA and AA or between sum of BCAA and AA expressed as Z-scores and insulin dose/kg of body weight, respectively.

Conclusion. The preliminary results suggest that in patients with long duration of diabetes and low beta-cell residual function evaluated by levels of C-peptide, BCAA and AA are not associated with insulin requirements.

Acknowledgments. This work was supported by an internal grant financed by the "Iuliu Haţieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca, Romania [4994/3/08.03.2016].

Studying Proteomics with Microcalorimetry

M. McGann[1], F. Supljika[2], S. Carrington[1]
[1]Malvern Panalytical Inc.
[2]Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Croatia
fsupljika@pbf.hr

Essentially all biological processes involve inter- and intramolecular interactions. The forces involved in these interactions are quantitated by thermodynamic parameters. Beyond thermodynamics, binding kinetics also provide a measure of the strength and nature of these interactions, which is critical to understanding the complete structure-function description of biomolecular interactions.

Microcalorimetry is an ultrasensitive technique that provides direct observations of thermal changes in a sample during these interactions. Differential scanning calorimetry (DSC) is used to study intramolecular interactions, such as protein unfolding and stability. Isothermal Titration Calorimetry (ITC) measures the enthalpy change, binding affinity, and stoichiometry of an intermolecular binding reaction, such as a protein-ligand or antibody-antigen interaction. This presentation will outline how these techniques are used in basic research, and drug discovery and development. We will also discuss how the data from these techniques can be combined with other biophysical characterization tools to better understand the implications of these properties on your research.

Integrating Redox Effects in Analysis of Biological Systems

C.M. Furdui
Professor, Department of Internal Medicine, Section on Molecular Medicine
Co-Director of Wake Forest Center for Redox Biology and Medicine
Director of Proteomics and Metabolomics Shared Resources
Wake Forest School of Medicine
cfurdui@wakehealth.edu

Background. Redox reactions govern all life on Earth and underlie development of many diseases.
Hypothesis. Development of reagents and methods for tracking redox processes in biological systems is critically needed to advance biomedical research and clinical care.
Aim. We aim to develop chemical tools for labeling sulfenylated proteins (-SOH) compatible with imaging (including PET imaging), mass spectrometry, flow cytometry, and Western blot workflows.
Methodology and Results. Multiple methods will be presented with associated results for select cases where these chemical tools were applied in biomedical and clinical research.
Conclusion. The results will highlight the value of combined chemical and high-end technologies in redox biology and medicine.

Acknowledgments. The work was supported by funding from the National Institutes of Health of USA under the following awards: R33 CA1777461, R01 CA136810, R21/R33 ES025645, and U01 CA215848.

Introducing ion mobility tandem mass spectrometry in glycoproteomics and glycolipidomics of human biopsies

M. Sârbu[1], Ž. Vukelić[2], D.E. Clemmer[3], A.D. Zamfir[1]

[1] National Institute for Research and Development in Electrochemistry and Condensed Matter, Timişoara, Romania

[2]Department of Chemistry and Biochemistry, University of Zagreb Medical School, Zagreb, Croatia

[3]Department of Chemistry, Indiana University, Bloomington, Indiana, United States of America

mirela.sarbu86@yahoo.co.uk

Background. Ion mobility separation mass spectrometry (IMS MS) opened new directions for structural analysis of biomarkers, due to its fundamental characteristic to separate isomers, isobars and conformers.

Hypothesis. Several studies have shown that the modified expression and also the elevated concentrations of glycopeptides and glycolipids in human patient biopsies as compared to healthy controls, serves for a disease diagnosis.

Aim. Implementation of a superior bioanalytical platform based on electrospray ionization (ESI) ion mobility mass spectrometry (IMS MS) in combination with collision-induced dissociation (CID) for mapping and structural analysis of glycopeptides and glycolipids (gangliosides, GGs) expressed in various human biopsies.

Methodology. The samples, dissolved in pure methanol, were infused into a Waters Synapt G2s at 2µL/min flow rate and 2 kV ESI voltage. To enhance the separation, IMS wave velocity was set at 650 m/s, IMS wave height at 40 V and IMS gas flow at 90 L/min. TOF analyzer was operated in the V-mode with an average resolution of 20,000. CID was performed after mobility separation in the transfer cell, using energies between 10 and 45 eV.

Results. The 2D plot of the GG mixture revealed not just their separation based on the charge state, but also on the carbohydrate chain length and the degree of sialylation. IMS MS technique in combination with collision induced dissociation (CID) MS/MS provided new insights into the ganglioside and glycopeptide composition and structure in the studied matrices. Moreover, the discovery of species modified by CH_3COO^- raises a series of issues regarding the cholinergic activity of GGs. Ion mobility separation following glycopeptides precursor ion sequencing by CID in the transfer cell was able to provide the nature and detailed structure of the isomers from a series of possible candidates.

Conclusion. The results demonstrate that IMS MS is a powerful and highly efficient technique able to unequivocally detect and characterize complex glycopeptides and glycolipids with potential biomarker role and discover new structures.

Acknowledgments. Supported by the Romanian National Authority for Scientific Research, UEFISCDI through projects PN-III-P4-ID-PCE-2016-0073, PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0046 granted to ADZ and PN-III-P1-1.1-PD-2016-0256 granted to MS.

Characterizing the molecular mechanism of the multifunctional antitumor compound withaferin A in a multiple myeloma model

M. Dom, W.Van den Berghe, X. Van Ostade
Laboratory of Protein Chemistry, Proteomics and Epigenetic Signaling (PPES), University of Antwerp, Universiteitsplein 1, 2610 Wilrijk, Belgium
Xaveer.VanOstade@uantwerpen.be

Despite progress and success in chemotherapy, many types of cancer remain largely incurable. Most often this is due to the development of (multi)drug resistance, a phenomenon characterized by cancer cells who manage to withstand the most powerful chemotherapies available during an acute anticancer response. In this respect, interest has recently focused on multifunctional chemotherapeutic compounds that simultaneously target a series of pathways, and by extend networks, peculiar to cancer development. Withaferin A (WA), a steroidal lactone from the plant Withania Somnifera, is such a multifunctional compound with promising antitumor responses.

To examine the pathways on which WA is acting, we used a multiple myeloma (MM) disease model for proteomics experiments, followed by pathway analysis with IPA.

A MM1R cell line was SILAC labeled and treated with- or left without WA to examine the WA effects on the cancer proteome. Two main approaches consisted of a differential expression experiment resulting in 121 upregulated and 77 downregulated (≤ 2 fold difference) proteins and a chemoproteomics approach resulting in 131 direct protein-WA interacting partners. Combining these data with the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) database resulted in many influenced canonical pathways, molecular functions and diseases including protein ubiquitination, NRF2 mediated oxidative stress response and Waldenstrom's macroglobulinemia.

Further validation of the high throughput data was based on these IPA output and confirmed that WA causes an accumulation of ubiquitinated proteins, most likely as a result of targeting the proteasome. Also, the upregulation of the NRF2 stress response gene Heme Oxygenase 1 (HMOX1) after WA treatment was confirmed, suggesting that WA probably puts the already stressed cancer cells under additional (fatal?) stress. Interestingly, 12 proteins were assigned to involve Waldenstrom's macroglobulinemia and 9 out of those 12 were influenced by WA in a way that would be beneficial for the disease outcome. For example, we showed by Western blot that annexin A4 (ANXA4), a calcium/phospholipid-binding protein which promotes membrane fusion, is downregulated after WA treatment, whereas it is seen upregulated in the disease. Other proteins within this Waldenstrom's macroglobulinemia "network" will be validated in the near future.

Acknowledgments. The work was supported by project no. G.0597.13N financed by the Research Council of Flanders, Belgium (FWO).

Histone deacetylases as potential therapeutic targets in atherosclerosis

A. Manea[1], S.A. Manea[1], M.L. Antonescu[1], A.G. Lazar[1], I.M. Fenyo[1], H. Muresian[2], M. Simionescu[1]

[1] *Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" of the Romanian Academy, Bucharest, Romania*

[2] *Cardiovascular Surgery Department, University Hospital of Bucharest, Bucharest, Romania*

Aim: Acetylation of histone and non-histone proteins, controlled by histone acetyltransferases and histone deacetylases (HDAC), plays a major in regulation of gene expression. Evidence exists that HDAC inhibitors display beneficial effects in several experimental models of cardiovascular diseases. The role of HDAC isoforms in atherogenesis is not completely understood. The aim of this study was to investigate the expression profile of representative HDAC isoforms in human and experimental atherosclerosis and to evaluate the potential anti-atherosclerotic effects of HDAC inhibition in ApoE-/- mice.

Methods: Human non-atherosclerotic and atherosclerotic samples and ApoE-/- mice were used. The mice, maintained on normal (ND) or high-fat cholesterol-rich diet (HD), were randomized to receive vehicle/suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). Oil red O was employed to assess lipid depositions. The expression of HDAC subtypes, oxidative stress and inflammatory markers were determined by Western blot /microscopy.

Results: The protein expression levels of HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC6, and HDAC11 isoforms were significantly induced in human atherosclerotic samples. Immunohistochemical staining of atherosclerotic lesions revealed that HDAC proteins are up-regulated within media and macrophage-rich areas. The increased expression of HDAC proteins, correlated with the severity of atherosclerotic lesions, was found in the aortas of ApoE-/- mice. Treatment of ApoE-/- (HD) mice with SAHA down-regulated the markers of oxidative stress (Nox1, Nox4, 4-HNE), vascular inflammation (NOS2, MMP9, CD68, CD45), matrix deposition and remodeling (fibronectin, MMP9), cell proliferation (PCNA), and reduced the extent of atherosclerotic lesions.

Conclusion. Our study provides evidence that pharmacological inhibition of HDAC may be an important therapeutic strategy in atherosclerosis.

Acknowledgements: Work supported by Romanian Academy and grants of the Romanian National Authority for Scientific Research (PN-III-P4-ID-PCE-2016-0665 and PN-III-P1-1.1-TE-2016-0851).

From low-resolution toxin-pattern recognition to toxin-resolved venom proteomes: New approaches in evolutionary and translational venomics

J.J. Calvete
Evolutionary and Translational Venomics Laboratory, CSIC, Valencia, Spain
jcalvete@ibv.csic.es

Venoms are integrated phenotypes used by a wide range of organisms for predatory and defensive purposes. The study of venoms is of great interest in diverse fields, such as evolutionary ecology and biotechnology. On the other hand, legitimate snake bites caused to humans in their share natural environment is a serious neglected public health issue that disproportionaly affects the most impoverished and geopolitically disadvantaged rural communities of tropical and subtropical countries. This occupational and environmental "disease of poverty" affects 1.8-2.7 million people worldwide each year, causing 85-138.000 deaths, maiming 400.000 victims, and leaving an indeterminate number of survivors with psychological sequelae and other posttraumatic stress disorders. Toxins bearing the highest prey incapacitation activity are often also the most medically important molecules in the context of a human envenoming. Ecological and translational venomics are two sides of the same coin. Thus, understanding the complexity of venoms and their locus-resolved toxicological profiles can shed light on the mutually enlightening relationship between evolutionary and clinical toxinology to identify those toxins that should be neutralized to reverse the psathological effects of venom. Omics technologies have contributed to understanding the evolutionary mechanisms that molded snake venoms to their present-day structural and functional variability lanscape. The recent implementation of top-down MS and absolute quantification of intact proteins by elemental mass spectrometry promise to represent a quantitative leap in the transition to achieve toxin-resolved venom proteomes. The quantitative analysis of an antivenom's ability to recognize and neutralize the toxins present in medically relevant snake venoms represents the cornerstone on which its preclinical qualification should be based. The recently developed immunoaffinity chromatography-based third-generation antivenomics (3GA) platform allows the toxin-resolved determination of the maximal toxin-binding capacity of an antivenom and to quantify the percentage of clinically effective antibodies present in a given antivenom. The conceptual and operational principles of 3GA will be discussed and illustrated with recent representative examples.

Discrimination of oral cancer from normal oral mucosa by MALDI mass spectrometry imaging of proteins and lipids

M. Gawin[*1], K. Bednarczyk*[*2], M. Chekan[1], A. Kurczyk[1], G. Mrukwa[2], M. Pietrowska[1], J. Polanska[2], P. Widlak[1]*

[1]*Maria Skłodowska-Curie Institute – Oncology Center, Gliwice, Poland*

[2]*Silesian University of Technology, Gliwice, Poland*

piotr.widlak@io.gliwice.pl

Background. Identification of molecular biomarkers for classification of cancer and differentiation between cancerous and normal epithelium remains a vital issue in the field of head and neck cancer.

Aim. To compare the ability of proteome and lipidome components to discriminate oral cancer from normal mucosa.

Methodology. Tissue specimens including squamous cell cancer and normal epithelium were analyzed by MALDI mass spectrometry imaging (MALDI-MSI). Two molecular domains of tissue components were imaged in serial sections – peptides (resulting from trypsin-processed proteins) and lipids (primarily zwitterionic phospholipids), then regions of interest corresponding to cancer and normal epithelium were compared.

Results. Heterogeneity of cancer regions was generally higher than heterogeneity of normal epithelium, and distribution of peptide components was more heterogenous than the distribution of lipid components. Moreover, there were more peptide components than lipid components that showed significantly different abundance between cancer and normal epithelium (median of the Cohen's size effect was 0.49 and 0.31 in case of peptide and lipid components, respectively). Multicomponent cancer classifier was tested (vs. normal epithelium) using tissue specimens from three patients and then validated with tissue specimen from the fourth patient. Peptide-based signature and lipid-based signature allowed cancer classification with weighted accuracy 0.85 and 0.69, respectively. Moreover, both classifiers had very high precision (0.98 and 0.94, respectively).

Conclusion. We concluded that though molecular differences between cancerous and normal mucosa were higher in proteome domain than in lipidome domain, imaging of lipidome components also enabled discrimination of oral cancer and normal epithelium. Therefore, both cancer proteome and lipidome are promising sources of biomarkers of oral malignancies.

Acknowledgments. The work was supported by National Science Centre, Poland, Grant 2016/23/B/NZ4/03901 and 2015/19/B/ST6/01736.

Application of tissue proteomics for understanding the prostate cancer initiation and progression

K. Davalieva[1], S. Kiprijanovska[1], S. Stavridis[2], O. Stankov[2], S. Komina[3], G. Petrusevska[3]*

[1]Research Centre for Genetic Engineering and Biotechnology "Georgi D Efremov", Macedonian Academy of Sciences and Arts, Skopje, Krste Misirkov 2, 1000 Skopje, R Macedonia

[2]University Clinic for Urology, University Clinical Centre "Mother Theresa", 1000 Skopje, R Macedonia

[3]Institute of Pathology, Medical Faculty, University "St. Cyril and Methodius", 1000 Skopje, R Macedonia

e-mail: katarina@manu.edu.mk

Background. Prostate cancer (PCa) is the second most frequently diagnosed cancer in men and the fifth leading cause of cancer death worldwide. Despite the use of prostate-specific antigen test and number of tests that appeared in recent years there are major concerns in the clinical management of PCa such as lack of efficient test for disease detection, lack of efficient test for disease progression and urgent need for development of effective treatments against lethal castration-resistant prostate cancer (CRPC).

Hypothesis. Proteomics analysis of prostate tissue can point out valuable biomarkers for early diagnosis, cancer progression and new drug targets for management of CRPC.

Aim. In this study we focused on molecular characterization of proteins associated with development and progression of PCa.

Methodology. Proteomics profiling of PCa tissue samples ranging from Gleason 6-9 obtained with radical prostatectomy was done on HDMS QTOF using label-free data independent acquisition.

Results. The proteins with altered abundance among groups were identified based on 2 or more peptides with fold change of 1.5 or more and statistical significance ($p \leq 0.05$) was corrected for multiple testing. The altered proteome was analyzed in terms of functional annotation, pathway analysis using IPA and correlation with clinical data. Proteins with altered abundance in PCa showed the highest significant correlation with immune response, lipid metabolism and oxidative stress response. Subset of these proteins exhibited consistent regulation trend (up- or down-) with cancer progression (Gleason from 6-9). These proteins are intracellular, ubiquitously expressed, and involved mostly in cell communication/signal transduction, cell growth and energy pathways. Majority of them have association and/or represent prognostic markers for different cancers, but up to our knowledge none has been associated with PCa so far.

Conclusion. The identified biomarkers are worthy of future pursuit as potential indicators of PCa initiation and/or progression towards aggressive forms.

Acknowledgements. This work was supported by the funds for Science of the Macedonian Academy of Sciences and Arts (grant no. 09-152/1).

The Bioluminescent HiBiT Technology for CRISPR-Mediated Gene Tagging

O. Ivanov
Promega GmbH, Mannheim, Germany
oleksii.ivanov@promega.com

Background. A common approach for investigating signaling mechanisms and the effects induced by synthetic compounds is through overexpression of recombinant tagged proteins. Nevertheless, it is well known that overexpression can cause artificial effects.
Hypothesis. Novel new method based on the combination of a new bioluminescent protein tagging system and CRISPR/Cas9 was developed to overcome these difficulties. This enables the cloning-free generation of endogenous protein assays and allows the simple quantification of intra- and/or extracellular protein levels after experimental manipulation under physiological conditions.
Aim. Study the proteins within their native environment by tagging of endogenous genes through CRISPR.
Methodology. A new protein tagging and detection method – the HiBiT system was developed. The technology is based on a split version of NanoLuc luciferase. The small tag size of HiBiT and the ability to measure protein expression at endogenous levels makes HiBiT well suited for CRISPR-mediated genome editing. We therefore, established a straightforward, cloning-free and rapid CRISPR/Cas9 protocol for the specific insertion of HiBiT into the genome. The applicability of this newly develop method is shown for hypoxia inducible factor 1A (HIF1α). The importance of low endogenous levels of expression in assay response is demonstrated.
Results. HiBiT is a tiny, bioluminescent, peptide tag that can be either expressed from a traditional expression vector or inserted into endogenous genes with a cloning-free CRISPR/Cas9 protocol. We were able to quantify proteins even at low endogenous expression levels in an antibody-free fashion with an exceptionally broad dynamic detection range. Here we present various applications of the HiBiT system such as the setup of protein stabilization/degradation assays (i.e. transcription factors, PROTACS, autophagy…) and GPCR internalization assays.
Conclusion. HiBiT can be rapidly and efficiently integrated into the genome to serve as a reporter tag for endogenous proteins within their native environment under the physiological conditions.

Personalized cancer immunotherapy using GM-CSF to activate the body defense

R. Vernet[1], O. Von Rohr[1], F. Passardi[2], T. Sebata[2], S.J. Gadher[2]
[1]Laboratoire d'Oncologie, Centre Médical Universitaire, Rue Michel-Servet, 1, 1211 Genève 4, Switzerland.
[2]Thermo Fisher Scientific, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008, USA.

Keywords: *GM-CSF, ELISA, tumour, vaccines, immunotherapy, personalized medicine.*

Despite the excitement of novel cancer therapies, many fall short of effectiveness against solid tumours in the human body including the CAR-T (chimeric antigen receptor -T cell) therapy, various combination therapies and cancer vaccines. With majority of the tumour antigens being self-antigens, the circulating patient tumour cell repertoire has developed sophisticated mechanisms to avoid detection and elimination as well as tolerance and an ability to grow, divide and spread without control in their tumour microenvironment. In addition to this, many tumours such as pancreatic cancer, ovarian cancer, lung cancer, and head and neck cancers are often detected at a very advanced stage, adding a further challenge to an effective treatment. Sad fact remains that the majority of cancer patients with metastatic or advanced cancer will die.

The ultimate “immunogen” remains the entire cancer cell itself. It comprises the entire set of targets. This together with sustained production of the immune-boosting white blood cell growth factor GM-CSF at the site of vaccination with appropriate antigens could triggers an immune response against the patient’s cancer cells, facilitating the destruction of the tumour as well as ‘firing-up’ the patient’s immune system, possibly leading to a cure rather than just prolonging life expectancy.

A cancer immunotherapy approach will be presented which facilitates the patient's own immune system to recognize parts of the tumour cells as targets to be destroyed. As opposed to other anti-cancer therapies, such an approach may help destroy the tumour and allow the patient to heal in a more natural way with a positive outcome.

Acknowledgments. The work was entirely carried out by Rémi Vernet[1] et al., with scientific support and expertise for GM-CSF from Thermofisher Scientific.

Proteomic and bioinformatic analyses of bone healing using titanium implant with bioactive targeted surface in a rat tibial defect model

R.M. Boteanu [1], V.I. Şuică [1], L. Ivan [1], F. Safciuc [1], E. Uyy [1], S.M. Croitoru [2], V. Grumezescu [3,6], L. Sima [4], C. Vlagioiu [5], G. Socol [3], F. Antohe [1]

[1]*Institute of Cellular Biology and Pathology "N. Simionescu", Romanian Academy, Bucharest, Romania*

[2]*Faculty of Engineering and Management of Technological Systems, Politehnica University of Bucharest, Romania*

[3]*National Institute for Lasers, Plasma and Radiation Physics, Bucharest, Romania*

[4]*Institute of Biochemistry, Romanian Academy, Bucharest, Romania*

[5] *Faculty of Veterinary Medicine, University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine of Bucharest, Romania*

[6]*Faculty of Applied Chemistry and Materials Science, Politehnica University of Bucharest, Bucharest, Romania*

raluca.haraba@icbp.ro

Background. Titanium (Ti) based implants are successfully used as biomedical devices due to their excellent mechanical and biocompatibility properties. However, impaired fracture healing may occur for different causes, leading to delayed unions or non-union fractures.

Hypothesis. The stratified co-incorporation of FGF2, VEGF and BMP4 in a polymer matrix applied on the Ti surface using dip coating can induce an improved healing process than the individual action of the biomolecules.

Aim. To test the regenerative potential of titanium implant with bioactive surface and to identify downstream protein effectors involved in bone healing in a tibial defect in rat.

Methodology. Eighteen adult male Wistar rats were randomly divided into 6 groups. The control (C) group received Ti implants without growth factors, three groups had implants individually coated with FGF2, VEGF and BMP4 and the multi-component implants containing FGF2/ VEGF and FGF2/ VEGF/ BMP4 were used for the last two groups. The bone tissues were suitably processed for histology and mass spectrometric analysis.

Results. Histological and histomorphometric analysis showed that the incorporation of the three growth factors in titanium adsorbed polymer matrix induced an improved healing process when compared with the other experimental groups. The shotgun proteomic approach allowed the high-confidence identification of 1614 in total out of which 113 were differentially expressed. Additionally, GO Slim Biological Processes analysis of differentially expressed proteins indicated a large number of proteins clustered in the *response to stimulus* class. Further, collinearity between these proteins was performed using Pearson correlation matrices. Next, the STRING database version 10.5 was used to reveal the possible protein networks of the correlated proteins. Based on confidence prediction of the interaction between proteins, we built protein networks visualized using Cytoscape 3.5.1. For the titanium implant designed with a PEG surface containing optimized proportions of FGF2, VEGF and BMP4, the general interaction was very well organized in hub-based networks related with *response to chemical*, *wound healing* and *response to stress* pathways.

Conclusion. The proteomics results of this study allow for a new and in depth insight of the complex healing process, but further investigations are required to truly understand the roles and how the interactions of differentially expressed proteins exert their impact on the repair process of bone fracture.

Acknowledgments. The study was supported by Romanian Academy and Research grant CNCSIS-UEFISCSU PN-II-PCCA-2011-3 no. 153/2012.

Thursday Posters

Western Blotting – the devil is in the details

B. Rebizak[1], P. Mielczarek[1,2], A. Bodzon-Kulakowska[1]
[1]Department of Biochemistry and Neurobiology, Faculty of Materials Science and Ceramics
University of Science and Technology, Kraków, Poland
[2]Laboratory of Proteomics and Mass Spectrometry, Institute of Pharmacology,
Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland
abk@agh.edu.pl

Background. Western Blotting is a well-established technique for measuring the amount of particular protein in the sample and is considered as a quantitative technique. Nevertheless, sometimes we forgot about the proper optimization of protein concentration in the sample, and we choose this value by judging the bands intensity "more or less" – with eyes, just looking for the "nice" bands.
Aim. Our aim was to show how measuring in a different protein concentration range may influence the final results.
Methodology. The microsomal fraction from rat liver (protein concentration: 20 mg/ml) was used during the experiments. The sample was prepared by acetone precipitation of proteins, then by centrifugation and mixing obtained protein pellet with the sample buffer. Defined protein concentrations were separated on 10% polyacrylamide gel, and electro-transferred from the gel onto the Immuno-Blot® PVDF membrane. Cytochrome 2C11 was detected using Anti-2C11 antibody, with TMB colorimetric visualization (GelDoc XR+, Bio-Rad).
Results. The curve for the visualization of the relationship between protein concentration and colorimetric results has been plotted. Then, protein concentrations (ratio 2:1) from two different ranges of the mentioned curve were taken, and the procedure was repeated to obtain the colorimetric results for these particular protein concentrations.
Conclusion. Obtained data suggest that the results of Western Blotting analysis should be considered with caution if proper optimization of the procedure was not performed. In our case, in the high protein concentration range, we obtained the value of colorimetric response equal to 1.1 (whereas it should be 2.0). It was expected since the curve of concentration/colorimetric response was not linear here. Nevertheless, in the linear range, we have obtained the value 3.1. Thus, our results stress the necessity of protein concentration optimization before performing a Western Blot analysis and interpretation of the results with caution.

Acknowledgments. The work was supported by "5th Polish-Taiwanese Joint Research Grant No. PL-TW/V/2/2018

Profiling of serum metabolome of head and neck cancer patients undergoing radiotherapy

A. Skowronek[1], L. Marczak[2], T. Rutkowski[1], Widlak[1], M. Pietrowska[1]

[1] *Maria Sklodowska-Curie Institute - Oncology Center, Gliwice Branch, Gliwice, Poland*

[2] *Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland*

agata.skowronek@io.gliwice.pl

Background. Cancer radiotherapy (RT) induces the response of the whole patient's body that could be detected at the blood level. Radiation-induced changes in proteome and transcriptome of serum have been widely described and discussed, however, metabolites present in blood have not been given as much attention. Metabolomics analysis of serum of cancer patients could also provide a valuable insight into the response of both tumor and whole organism to the treatment.

Hypothesis. Local irradiation during cancer radiotherapy induces whole-body responses that can be observed at the blood metabolome levels.

Aim. Comparison of serum metabolome profiles in head and neck cancer patients before and after radiotherapy.

Methodology. Serum samples from head and neck cancer patients (10 patients) were taken before (A) and after (B) radiotherapy. Healthy volunteers (10 individuals) were used as a control group. A mixture of MeOH/H_2O was used for extraction of low-molecular-weight metabolites. Samples were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Results. Changes in the level of several compounds were observed between samples collected before and after irradiation. There were 8 compounds, whose levels significantly decreased in post-treatment samples: Creatinine, L-Tryptophan, Ethanedioic acid, L-Alanine, L-Isoleucine, L-Proline, L-Leucine, Uric acid. There were 10 compounds, whose levels significantly increased in post-treatment samples: (R,S)-3,4-Dihydroxybutanoic acid, 3-Hydroxybutyric acid, 2,3-Butanediol monoacetate, Glucuronic acid, Galactonic acid, Octadecanoic acid methyl ester, 3-Methyl-2-ketobutyric acid, 3-Methyl-2-ketovaleric acid, 2-Ketobutyric acid, 2-Hydroxybutyric acid.

Conclusion. Radiotherapy caused significant changes in levels of several serum metabolites. This preliminary study will be followed by an analysis of metabolites present in extracellular vesicles (EVs) isolated from corresponding serum samples.

Acknowledgments. This work was supported by the National Science Centre, Poland, grant no. 2013/11/B/NZ7/01512.

Analyses of glycolipid-peptide and glycolipid-protein interactions by chip-based mass spectrometry

A.D. Zamfir[1], *M. Sârbu*[1], *Ž. Vukelić*[2]

[1] *National Institute for Research and Development in Electrochemistry and Condensed Matter, Timişoara, Romania*

[2]*Department of Chemistry and Biochemistry, University of Zagreb Medical School, Zagreb, Croatia*

alinazamfir.ro@gmail.com

Background. Gangliosides are localized in the plasma membrane, with the ceramide (Cer) portion rooted in the lipid bilayer and the oligosaccharide chain protruding freely outside the cell, acting as a receptor. Cholera toxin action is initiated by binding to the target cell surface via interaction between homopentameric B subunit (Ctb5) and the receptor molecules in the microdomains.

Hypothesis. Several studies have indicated that during the binding process, the molecule that serves as the cell-surface receptor of Ctb5 is preferentially GM1.

Aim. To study the noncovalent interaction between the subunit B of Cholera toxin (Ctb) and a native mixture of gangliosides extracted from adult human cerebellum by fully automated chip-nanoelectrospray ionization (nanoESI) on a NanoMate robot coupled to a high capacity ion trap (HCT) mass spectrometer (MS).

Methodology. The interaction assay involved the incubation of Ctb5 and gangliosides dissolved in 10mM ammonium acetate buffer at pH 5.8. This pH value enhanced the dissociation of the monomers constituting Ctb5 and allowed the direct interaction between the monomers and gangliosides. Aliquots of the reaction products were collected directly after 10, 30, and 60min of incubation in the 96-well plate of the NanoMate robot and immediately submitted to MS analysis.

Results. The noncovalent interaction assay followed by chip-based nanoESI MS results suggested for the first time that, exposed to a highly complex mixture of gangliosides under conditions facilitating the interaction, Ctb preferentially binds G1 class, irrespectively of the number of sialic acid residues or other modifications. Moreover, certain species of high sialylation degree or modified by fucosylation were for the first time discovered in human cerebellum.

Conclusion. This platform represents a method of choice not only for assessing the noncovalent interactions but also for the detection and identification of species of low expression in complex mixtures.

Acknowledgments. Supported by the Romanian National Authority for Scientific Research, UEFISCDI through projects PN-III-P4-ID-PCE-2016-0073, PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0046 granted to ADZ and PN-III-P1-1.1-PD-2016-0256 granted to MS.

Proteomics discloses effect of saffron stigmata ethanolic extract on restoring viability in HepG2 cells under VCP gene silencing

G. Bazylak [1]*, *T.L. Pan* [2,3], *P.W. Wang* [2,4], *Y.L. Leu* [5], *T.H. Wu* [6,7], *Y.C. Wu* [6]

[1]*Department of Pharmaco-Bromatology & Molecular Nutrition, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, Bydgoszcz, Poland;*
[2]*School of Traditional Chinese Medicine,Chang-Gung University, Taoyuan, Taiwan;*
[3]*Liver Research Center, Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan, Taiwan;*
[4]*China Medical University Hospital, China Medical University, Taichung, Taiwan;*
[5]*Graduate Institute of Natural Products, Chang-Gung University, Taoyuan, Taiwan;*
[6]*Graduate Institute of Natural Products, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan;*
[7]*Division of Cardiovascular Surgery, Kaohsiung Veterans General Hospital, Kaohsiung,Taiwan*
gbazylak@cm.umk.pl

Background. Disruption of valosin-containing protein (VCP) is sufficient to cause endoplasmaic reticulum (ER) stress in hepatocytes during ischemia-reperfusion (IR).
Hypothesis. Novel ethanolic extract KAREX [1], obtained from dry stigmata of *C. sativus* L. (saffron) with kaempferol content up to 20% (w/w), have been proposed to overcome the VCP related control of ubiquitination status of recruited substrates initiated by IR in hepatocytes.
Aim. To assess the proteomic action of KAREX on pro-apoptotic cell cycle after siRNA mediated silencing of VCP gene in transfected epithelial-like human hepatocellular carcinoma cells ($HepG_2$).
Methodology. Transient transfection of $HepG_2$ cells by VCP-gene targeting by three smart pool siRNA, incubation with KAREX (100 μg/mL) and viability quantitation by MTT assay. Flow cytometry after staining of DNA fragmentation for assay of apopototic $HepG_2$ cells. Global proteomic analysis using 2-DE coupled with MALDI-TOF-MS. Western immunobloting to confirm protein expression.
Results. Depletion of VCP in $HepG_2$ cells induced the *S*-phase cell cycle accompanied by higher proportion of induced sub-G1 phase peak as the reliable marker of apoptosis. KAREX treatment of VCP depleted $HepG_2$ cells significantly decreased the *S*-phase cell cycle arrest. Proteomic data indicated that VCP modification cause abnormal peroxiredoxins accumulation and ultimately trigger ER-dependend $HepG_2$ cell death.
Conclusion. The preliminary results suggest that KAREX could significantly protect from initiation of early apoptotic cell death in hepatocytes triggered by the VCP abolishment under IR injury condition, thus giving a novel hypothesis on the *in vivo* molecular mechanisms of KAREX in range of common ischemic diseases.

Acknowledgments. National Science Research Grant of Taiwan (NSC-98-230-B-182-017), Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan, Taiwan (CMRPD170192) and Nicolaus Copernicus University, Bydgoszcz, Poland (UPB-407/449-2017/18).
References: [1] Bazylak G, Wu TH, Wang PW, Pan TL, Leu YL, Wu YC, Basic Clin Pharmacol Toxicol 2017; 121(Suppl. 5): 17.

EYA3 tyrosine phosphorylation by Src kinase. From mass spectrometry to implications in proliferation

A.E. Ionescu[1], M. Menţel[2], A.C. Leney[3,4], C.V.A. Munteanu[5], A.J. Heck[3,4], Ş.E. Szedlacsek[1]

[1]Department of Enzymology, Institute of Biochemistry of the Romanian Academy, Splaiul Independenţei 296, Bucharest, Romania

[2]Regional Institute of Oncology, TRANSCEND Research Center, Iaşi, Romania

[3]Biomolecular Mass Spectrometry and Proteomics, Bijvoet Center for Biomolecular Research and Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Utrecht University, The Netherlands

[4]Netherlands Proteomics Centre, Utrecht, The Netherlands

[5]Department of Bioinformatics and Structural Biochemistry, Institute of Biochemistry of the Romanian Academy, Splaiul Independenţei 296, Bucharest, Romania

Eyes absent (EYA) are both non-thiol based protein tyrosine phosphatases (PTP) and transcriptional co-activators. They are members of a conserved regulatory network with functions in the development and homeostasis of various tissues and organs. Although the overexpression of EYAs has been reported in several types of cancers and its PTP activity proven to be involved in generating and maintaining these pathologies, their molecular mechanisms need further elucidation.

We hypothesize that EYA's molecular tools for signaling may be represented by both tyrosine phosphorylation and its capacity of autodephosphorylation. To verify these, we used mass spectrometry to study both Src-phosphorylation of human EYA3 and its capacity of autodephosphorylation, and proliferation assays to identify physiological implications for some of the phospho-tyrosine residues detected.

Initially, we identified the tyrosine residues on EYA3 WT and EYA3 D311N that are phosphorylated after *in vitro* incubation with Src at several time points. Successive tyrosine to phenylalanine mutations were made on EYA3 inactive mutant in order to verify the phosphorylation status of the detected sites in mammalian cells. The results obtained, after the quantification of the phosphorylation signal on western blots, revealed that some sites have a major impact and others minor contribution to the total phosphorylation. A set of tyrosine residues were most intensely phosphorylated by Src and they also could not be completely autodephosphorylated. For these tyrosines residues, we further investigated the implication of Src-induced phosphorylation on the proliferation of HEK 293T, MCF-7 and MDA-MB-231cells. The results obtained indicated that the impact on proliferation differs depending on the cell type in which the EYA constructs are expressed.

Acknowledgments. This work received financial support through the project entitled "CERO – Career profile: Romanian Researcher", grant number POSDRU/159/1.5/S/135760, co-financed by the European Social Fund for Sectoral Operational Programme Human Resources Development 2007-2013 and the project entitled "Idei", contract no. 296/ 05.10.2011, project code PN-II-ID-PCE-2011-3-0743.

Nicotinamide mononucleotide (NMN) effects on mitochondrial OXPHOS protein expression

G.C. Marinescu[1, 2, 3], R.G. Popescu[1, 2, 3], A.Dinischiotu[1]
[1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Bucharest, Bucharest, Romania
[2]Independent Research Association, Bucharest, Romania
[3]Blue Screen SRL, Bucharest, Romania
Catalin.Marinescu@independent-research.ro

Background. Type 2 diabetes, a chronic and progressive disease with continuously increasing prevalence, drains more than 10% of global health budget. Although the molecular mechanism causing insulin resistance is not clear, recent studies show correlations with mitochondrial dysfunctions that may result from impaired mitochondrial biogenesis, deficiencies in mitochondrial electron transport chain (mtETC) or increased production of reactive oxygen species (ROS) in mitochondrial intermembrane space. Some studies suggest that a recent proposed mitochondrial biogenesis pathway (NAD^+/SIRT1/VHL/HIF1α/c-Myc/TFAM) is lost with aging and hypercaloric diet causing insulin resistance and other aging related disease, but can be restored by a short period treatment with nicotinamide mononucleotide (NMN), a NAD^+ precursor.
Hypothesis. NMN restores mitochondrial encoded OXPHOS proteins expression in muscle cells.
Aim. To assess the effect of NMN on mitochondrial OXPHOS proteins expression.
Methodology. Cultured C2C12 myotubes were maintained for two days in normo- respective hyper-glycemic conditions. In the third day, the myotubes were incubated for 24 h in the absence or presence of 100 μM NMN. The myotubes were then harvested and lysed. Proteins form mitochondria enriched fractions extracted by differential centrifugation were purified by chloroform-methanol precipitation. The peptides resulted by trypsin digestion of these proteins were resolved by 2D chromatography (SCX-RP), detected by ESI+ MS/MS Velos Pro linear Ion trap using a Top5 method, identified with Proteome Discoverer and relatively quantified by peptide-spectrum match (PSM).
Results. Most of the components of OXPHOS complex I where up-regulated in normo-glycemic NMN treated myotubes compared to untreated control. In hyper-glycemic conditions NMN treated cells OXPHOS subunits IV and V were over-expressed. Mitochondrial encoded COX2a4 subunit of complex IV is under expressed while all the other subunits (nuclear encoded) were over-expressed.
Conclusion. NMN modulates mitochondrial OXPHOS proteins expression but this study shows results contrary to the NAD^+/SIRT1/VHL/HIF1α/c-Myc/TFAM mitochondrial biogenesis pathway hypothesis.

Acknowledgments. This work was supported by Independent Research Association, Bucharest, Romania.

Mass spectrometry and T cell analysis reveals that N-glycosylation can impact antigen presentation in melanoma

G.N. Chirițoiu[1], C.V.A. Munteanu[2], C. Jandus[3], S. Ghenea[1], P. Romero[3], S.M. Petrescu[1]
1Department of Molecular Cell biology, Institute of Biochemistry of the Romanian Academy (IBRA), Bucharest, Romania
2Department of Bioinformatics and Structural Biochemistry, Institute of Biochemistry of the Romanian Academy (IBRA), Bucharest, Romania
3Ludwig Cancer Research Center, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland
cristian.munteanu@biochim.ro

Background. Recent epidemiologic studies have revealed that the incidence and mortality of melanoma has globally increased in the past years. Immunotherapy has provided a good alternative to the conventional treatment of melanoma, mainly due to its low toxicity.
Hypothesis. Understanding the factors that can modulate epitope presentation in melanoma is a key-step in the development of new antigens capable of eliciting an increased immune response, in order to eradicate the tumor cells.
Aim. Assess the exact contribution of N-glycosylation located within or outside an epitope to antigen presentation.
Methodology. Tyrosinase N-glycosylation status in melanoma was analyzed using mass spectrometry. A375 melanoma cells expressing different tyrosinase glycosylation mutants were designed and characterized using biochemical methods. The cells were subject to cell surface acid elution for mass spectrometry analysis of a human tyrosinase derived epitope. The peptide was relative quantified in each condition and the results were validated in tumor recognitions assays using human CD8+ T cell clones directed against this epitope.
Results. In agreement with the prediction analysis, we show that human tyrosinase is glycosylated to all seven sites, in A375 melanoma cells. Moreover, the C-terminus glycans appears more important for peptide presentation, especially considering the localization of one these N-glycosylation sites within the epitope.
Conclusion. Tyrosinase is glycosylated in A375 melanoma cells and the position of the glycosylation sites can alter epitope presentation in A375 melanoma cells.

Acknowledgments. The work was supported by project TYRPRES, Project Ro-Swiss IZERZ0_142216, by UEFISCDI Grant PN-III-P1-1.1-PD-2016-1528 and the Romanian Academy.

Methionine-induced hyperhomocysteinemia causes changes in the mouse kidney proteome associated with blood coagulation

I. Bielińska[1], M. Sikora[1], H. Jakubowski[2,3]
[1]European Centre for Bioinformatics and Genomics, Institute of Bioorganic Chemistry, Poznan, Poland
[2]Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Life Sciences, Poznan, Poland
[3]Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, Rutgers University, New Jersey Medical School, Newark, NJ, USA
ibielinska@ibch.poznan.pl

Background. Homocysteine (Hcy) arises from the metabolism of methionine (Met). Inordinate consumption of Met causes hyperhomocysteinemia (HHcy), which is linked to pathologies in the cardiovascular system. However, underlying mechanisms are not fully understood.
Hypothesis. We hypothesize that HHcy induces changes in gene expression that impair kidney homeostasis, which in turn can lead to increased blood coagulation and thrombotic complications.
Methodology. We induced dietary HHcy by providing 3-month old C57BL/6J mice (n=8) with 1% Met in drinking water for 3-months. Control mice (n=8) received a plain water. Kidney proteomes were analyzed using label-free relative quantitative mass spectrometry. Proteins identified by at least 2 peptides and p values <0.05 for Met vs. control mice were considered as differentiating. Bioinformatic analyses were carried out using DAVID resources.
Results. We identified 36 kidney proteins with expression significantly altered by HHcy: 19 up- (e.g., Ctsa, Acat1) and 17 down-regulated (e.g., Fga, Ces1c). One of the KEGG pathways overrepresented in kidneys of HHcy mice is complement and coagulation cascades (12, 7-fold). The GO biological processes analysis revealed that the affected proteins participate in fibrin clot formation and fibrynolysis (e.g., Fga, Fgb, Fgg) .
Conclusion. These findings show that Met-induced HHcy dysregulates kidney proteostasis and induces pro-thrombotic changes that are associated with cardiovascular disease.

Acknowledgments. The work was supported by NCN grants: 2014/15/N/NZ5/016472015/ 17/D/NZ5/03444.

Two strategies for processing of human cerebrospinal fluid prior LC-MS/MS

E. Jankovska [1], O. Vit [1], M. Svitek [2], K. Holada [3], J. Petrak [1]
[1]BIOCEV; First Faculty of Medicine, Charles University, Vestec, Czech Republic
[2] Department of Anesthesiology and Intensive Care, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic
[3] Institute of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic.
eliska.doktorova@lf1.cuni.cz

Background. Cerebrospinal fluid (CSF) is a complex body fluid which is in direct contact with the central nervous system. This makes CSF an attractive source of potential biomarkers for neurologic diseases. Similarly to blood plasma, proteomic analysis of CSF is complicated by high dynamic range of individual protein concentrations and by the presence of several highly abundant proteins.
Aim. Since there is no specific method for relative depletion of the abundant proteins in CSF, we evaluated the effect of two different methods developed for human plasma.
Methodology. Triplicate samples of pooled human CSF were either immunodepleted using MARS 14 cartridge (Agilent) or subjected to the relative enrichment of low abundance proteins using hexapeptide ligand library known as ProteoMiner (Bio-Rad). All resulting fractions were digested with trypsin and analyzed by standard LC-MS/MS.
Results. LC-MS/MS analysis of crude CSF provided roughly 500 identified protein groups. Immunodepletion of CSF with MARS 14 cartridge increased the number of identifications to nearly 800, while treatment of CSF using ProteoMiner ligand library to only 600. To maximize the number of identified proteins we analyzed also the "waste" fractions generated in both methods: The fraction of proteins retained by the MARS 14 cartridge-contained more than 100 additional proteins not observed in the depleted CSF. Similarly, analysis of the ProteoMiner "waste" flow-through fraction provided 70 unique proteins.
Conclusion. Both strategies significantly increased the number of identified proteins compared to crude CSF. The immunodepletion strategy using MARS 14 enabled us to identify a higher number (800+100) of proteins in the depleted CSF and "waste" fraction compared to ProteoMiner treatment (600+70 proteins). Due to limited availability of CSF samples, it is advisable to prefer MARS 14 technology over ProteoMiner. Additional analysis of the "waste" fraction can significantly increase the number of identified CSF proteins.

Acknowledgments. Supported by grants AZV 15-32961A (Ministry of Health of the Czech Republic) and SVV 260 374/2018 (1. LF UK).

iTRAQ based proteomic analysis of Zika virus infection based on 293T cells.

J. Ner-Kluza[1], A. Milewska[2,3], A. Dąbrowska[2,3], P. Mielczarek[4], K. Pyrć[2,3], P. Suder[1]
[1] *Department of Biochemistry and Neurobiology, Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH University of Science and Technology, Krakow, Poland*
[2] *Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Krakow, Poland*
[3] *Malopolska Centre of Biotechnology, Jagiellonian University, Krakow, Poland*
[4]*SINTEF Institute of Pharmacology Polish Academy of Science, Krakow, Poland*
ner.kluza@agh.edu.pl

Background. ZIKV is a single stranded, positive sense RNA virus transmitted by *Aedes* mosquito. ZIKV infection is connected with various complications, including Guillain–Barré syndrome and congenital microcephaly, if pregnant women are infected. In recent years this virus has been assigned as a public health emergency, because of fast and easy spread into world areas where ZIKV is not endemic.
Hypothesis. Based on the global research results, which proved that the viral NS2B-NS3 protease plays crucial role in the viral infection cycle, activity of viral protease NS3 have been proposed to study action allowed for providing the proteomic results of great importance in viral infection investigations.
Aim. To find the expression changes in the proteome between samples with active NS3 protease and the control ones, using iTRAQ MS-based analysis.
Methodology. In these studies, a 293T cell model was used in three biological replicates. 293T cells with transfected active NS3 protease (cloned in the *E. coli* model) were compared to control 293T cells with inactive form of this protease (point mutation: $S^{135} \rightarrow A$). The cells were suitably prepared for further proteomic quantitative analyses. Protein labelling was performed according to the manufacturer protocol tor the iTRAQ 4-plex (AB Sciex). For off-line *nano*LC analysis Proxeon EASY-nLC II coupled with Proteineer fc II (Bruker-Daltonics) was applied. Mass spectrometry analysis of peptides in positive ion mode was done using UltrafleXtreme™ MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker-Daltonics). Protein identification was performed using the MASCOT software (Matrix Science) with the aid of UniProt KB database.
Results. iTRAQ proteomic approach was performed to identify the potential targets for NS3 protease or proteins with changed expression evoked by cells proteome interaction with NS3 protease. Among all the identified proteins, the most promising tagets are proteins involved in infection and inflammation processes, responsible for regulation of apoptosis, transcriptional regulation.
Conclusion. Designing the quantitative proteomic approach to study influence of action of the NS3 protease in 293T cells, allowed for providing the interesting results which might have important meaning in viral infection investigations. This results will be base for further research in this field.

Acknowledgments. The work was supported by project no. 2016/21/B/NZ6/01307 financed by the Polish National Science Center.

Activity of neuropeptides converting enzymes

K. Piechura[1], G.A. Zingale[2] , P. Mielczarek[1,3], J. Silberring[1,4]
[1] Department of Biochemistry and Neurobiology, AGH University of Science and Technology, Cracow, Poland
[2] Department of Chemical Science, University of Studies of Catania, Italy
[3] Laboratory of Proteomics and Mass Spectrometry, Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Cracow, Poland
[4] Centre of Polymer and Carbon Materials, Polish Academy of Sciences, Zabrze, Poland
kinga.piechura24@gmail.com

Background. Neuropeptides occur in both central and peripheral nervous systems, where they play important, mediatory role in many processes. Biological activity of various neuropeptides is regulated, among other factors, by converting enzymes, that transform native neuropeptides into products with retained or changed biological activity.
Hypothesis. Because of the function of neuropeptides in neurotransmission and neuromodulation, mechanism for conversion of these compounds have received considerable attention. Identification of the released products is important to understand the pharmacological activity of these peptides and their mechanisms of action.
Aim. This work is focused on measuring proteolytic activities of the converting enzymes specifically acting on the opioid peptides, such as dynorphin B and nociceptin, that allow to investigate, which potential cleavage sites of that neuropeptides are crucial as primary targets of enzyme action. This may also provide a knowledge on the function of these enzymes in the regulation on neuropeptides levels.
Methodology. The spinal cord homogenates was fractionated by ion exchange chromatography. Fractions were collected and incubations of each fraction with dynorphin B and nociceptin were performed. Enzyme activity was monitored by measuring the formation of cleavage fragments by MALDI mass spectrometry.
Results. The activities of enzymes that convert dynorphin B and nociceptin were observed. In case of both dynorphin B and nociceptin converting enzymes, the optimal pH of enzyme activity was defined. Identification of cleavage fragments was performed by MALDI mass spectrometry. Moreover, classification of these peptidases based on selective inhibitors was performed.
Conclusion. In the present work, the fragments that are released from neuropeptides such as dynorphin B and nociceptin as a result of neuropeptides convertases activity, have been identified.

Search of peripheral markers associated with pathogenesis of schizophrenia

L. Smirnova[1], E. Dmitrieva[1], A. Seregin[1], A. Letova[3], A. Semke[1], V.Zgoda[2]
[1]*Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia*
[2] *Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia*
[3]*Siberian State Medical University, Tomsk, Russia*
lpsmirnova@yandex.ru

Background. Schizophrenia is the most important mental disorders for social life. Since diagnostics of mental disorders is based only on clinical symptoms, there is a necessity in development of additional methods of biochemical/paraclinical diagnostics.
Hypothesis. However, no protein markers typical only for distinct disease are found still.
The proteomics approach enables to specify distinct minor proteins which can help to decipher molecular mechanisms/pathways involved in endogenous mental disorders.
Aim. Serum proteomes of patients with schizophrenia and healthy subjects are compared in the present study.
Methodology. For the research we used the serum of healthy and patients with schizophrenia. Preparation of samples included: purification from serum major proteins by affinity chromatography, separation of proteins by one-dimensional electrophoresis, in-gel tryptic hydrolysis of the separated proteins. LC-MS/MS analysis of the resulting peptides using mass spectrometer with an ion trap XCT Ultra. The protein was quantified by the ELISA method. Identification of proteins was carried out using Mascot software Ver. 2.1 («Matrix Science», USA).
Results. When comparing proteome profiles, different unique protein sets were revealed: 23 proteins typical for schizophrenia. Protein set in schizophrenia was mostly associated with nucleic acid and protein metabolism, immune response, cell communication, and cell growth and maintenance. Significant difference between groups was revealed in ANKRD12 concentration ($p = 0.02$), with maximum elevation of ANKRD12 concentration in schizophrenia.
Conclusion. Our results are presumably useful for discovering the new pathways involved in schizophrenia.

Acknowledgments. The study was supported by RSF, grant № 18-15-00053. Mass spectrometric analysis was carried out using the equipment of "Human Proteome" Core Facility of the Institute of Biomedical Chemistry (IBMC) Moscow which is supported by Ministry of Education and Science of the Russian Federation (unique project ID RFMEFI62117X0017), which did not provide financial assistance for research.

Proteome profiles of different types of thyroid cancers

M. Gawin[*1], A. Wojakowska*[*1], M. Pietrowska*[*1], Ł. Marczak[2], M. Chekan[1], P. Widłak[1]*

[1] *Maria Sklodowska-Curie Institute - Oncology Center, Gliwice Branch, Gliwice, Poland*

[2] *Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland*

monika.pietrowska@io.gliwice.pl

Background. The majority of patients with thyroid cancer are diagnosed based on fine needle aspiration cytology (FNAC) of thyroid nodules. Further diagnosis is performed based on histopathological intra- or post-operative examination of the resected thyroid tissue. However, in some cases, cytological and histological patterns are ambiguous and proper classification is problematic.

Hypothesis. Classification of thyroid cancers might be improved markedly if new biomarkers identified with the use of high-throughput „omics" approaches could support diagnosis based on histopathological patterns.

Aim. To perform proteomics profiling of tissue specimens representative for major types of thyroid cancers: papillary (classical and follicular variant), follicular, anaplastic and medullary, as well as benign follicular adenoma using shotgun LC-MS/MS approaches.

Methodology. Protein extracts from archival FFPE cancer tissue samples were analyzed using a combination of Orbitrap and MALDI-TOF approach.

Results. Protein products of 5700 unique genes were identified. In general, a large difference between medullary, anaplastic and epithelium-derived differentiated cancers (papillary and follicular) was detected. Proteins characteristic for medullary and anaplastic cancers included factors associated with neuroendocrine functions and factors typically associated with advanced malignancies, respectively. A comparable overall similarity of follicular cancers to both variants of papillary cancers was found. Moreover, follicular adenoma showed higher overall similarity to follicular cancer than to either variant of papillary cancer. Proteins discriminating differentiated thyroid neoplasms included factors associated with lipid and hormone metabolism, regulation of gene expression and maintenance of DNA structure.

Conclusion. Several novel biomarker candidates of thyroid cancer subtypes were detected. Moreover, proteome data matched several features of transcriptome and metabolome profiles of thyroid cancers contributing to systems biology of this malignancy.

Acknowledgments. This work was supported by the National Science Centre, Poland, Grant 2012/07/B/NZ4/01450. MG was supported by DZP/PBS3/245247/2014 Grant (BIOTEST). Experiments were performed using research infrastructure built in the frame of projects POIG.02.01.00-00-166/08 (BIOFARMA), POIG.02.03.00-14-084/13 (ONKOSYS) and POIG.02.03.01-00-040/13 (SYSCANCER).

Ionizing radiation affects the composition of proteome of exosomes released by head and neck carcinoma in vitro

A. Abramowicz[1], Ł. Marczak [2], M. Smolarz[1], M. Gładysińska[3], P. Widłak[1], M. Pietrowska[1]

[1] *Maria Sklodowska-Curie Institute - Oncology Center, Gliwice Branch, Gliwice, Poland*

[2] *Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland*

[3] *The Jan Kochanowski University in Kielce, Institute of Biology, Kielce, Poland*

mateusz.smolarz@io.gliwice.pl

Background. Exosomes and other extracellular vesicles are key players in cell-to-cell communication. They are proposed to be involved in different aspects of the response to ionizing radiation, including transmitting radiation-induced bystander effect and mediating radio-resistance.

Hypothesis. The functional role of exosomes depends on their molecular cargo, including proteome content.

Aim. To establish the proteome profile of exosomes released in vitro by irradiated cells derived from oral cancer and to identify processes associated with radiation-affected proteins.

Methodology. Exosomes and other small extracellular vesicles were purified by size-exclusion chromatography from cell culture media collected 24 hours after irradiation of cells with a single 2, 4, and 8 Gy dose, and then proteins were identified using a shotgun LC-MS/MS approach.

Results. In general, exosome-specific proteins encoded by 1217 unique genes were identified. There were 472 proteins whose abundances in exosomes were significantly affected by radiation (at any dose), including 425 upregulated and 47 downregulated species. The most numerous group of proteins affected by radiation (369 species) included those with increased abundance at all radiation doses (≥2 Gy). Several functional GO terms were associated with radiation-affected exosome proteins. Among over-represented processes were those involved in response to radiation, metabolism of reactive oxygen species, DNA repair, chromatin packaging and protein folding.

Conclusion. The protein content of exosomes released by irradiated cells indicates their actual role in mediating the response to ionizing radiation.

Acknowledgments. This work was supported by the National Science Centre, Poland, grant no. 2013/11/B/NZ7/01512.

Molecular changes in kidneys during chronic heart failure

M. Behounek[1], M. Chmel[1], T. Havlenova[2], V. Melenovsky[2], L. Cervenka[2], J. Petrak[1]
[1]BIOCEV, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic
[2]Institute for Clinical and Experimental Medicine (IKEM), Prague
Matej.Behounek@lf1.cuni.cz

Background/Aims: Chronic heart failure (CHF) influences normal kidney function and leads to cardiorenal syndrome that further promotes HF progression. To describe the molecular changes in kidneys during CHF, we performed comprehensive proteomic analysis of kidneys from an established rat model of HF.
Methodology. CHF in rats was induced by volume overload of heart due to surgically created aorto-caval fistula (ACF). After 21 weeks, cardiac and renal functions were studied and quantitative proteomic analysis of kidney samples was performed.
Results. CHF rats had cardiac hypertrophy, increased left ventricular end-diastolic pressure and showed signs of systemic and pulmonary congestion. Kidneys of HF rats had reduced renal blood flow, decreased sodium excretion and urine production. We performed three independent iTRAQ analyses including sample extraction, labeling, fractionation and LC-MS/MS. We identified almost 4000 proteins with FDR 0.01. HF rat kidneys showed 67 significantly differentially expressed proteins (>1.5-fold) compared to control kidney samples. The most upregulated protein was angiotensin-converting enzyme (ACE, >20-fold), which is the rate-limiting enzyme responsible for conversion of angiotensin-I into vasoactive angiotensin-II (ANG-II). The second most strongly upregulated protein was advanced glycosylation end product-specific receptor (RAGE, 14-fold). RAGE activation triggers proinflammatory response and promotes nephropathy. Among other markedly upregulated proteins were periostin (6.8-fold), caveolin-1 (4.5-fold) and other proteins involved in endothelial function (vWF, cavins 1-3, T-kininogen-2), proteins of ECM activation (MFAP4, collagen-VI, galectin-3, FHL-1, calponin), molecules involved in glomerular filtration integrity (CLIC5, ZO-1) and carboxylesterase-1D (CES1D) – the enzyme which converts most ACE inhibitors into active drugs.
Conclusion. Chronic heart failure is associated with kidney dysfunction and with marked changes in kidney proteome. Enhanced ANG-II signaling appears to be the dominant molecular feature of HF-induced kidney injury. Other proteins upregulated in HF kidneys, such as RAGE, periostin or caveolins show potential mechanistic links with enhanced ANG-II action. This study is the first that provides evidence supporting the involvement of RAGE in pathogenesis of HF-related kidney injury. Some of the differentially expressed proteins may serve as future markers and/or therapeutic targets for cardiorenal syndrome.

Acknowledgments. The study was funded by The Czech Science Foundation (GAČR 15-14200S), Ministry of Education (Progress Q26, NPU II – LQ1604, SVV 260 374, UNCE/MED/016).

ZIKA virus NS3 protease: substrate specificity investigations

J. Ner-Kluza[1], K. Kosowicz[2], A. Milewska[2], A. Dąbrowska[2], K.A. Pyrć[2,3], P. Suder[1]*
[1]Department of Biochemistry and Neurobiology, Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH University of Science and Technology, Mickiewicza 30 ave., 30-059 Krakow, Poland
[2] Department of Microbiology, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Gronostajowa 7, 30-387 Krakow, Poland.
[3]Malopolska Centre of Biotechnology, Jagiellonian University, Gronostajowa 7a, 30–387 Krakow, Poland
**corresponding author*
e-mail address: piotr.suder@agh.edu.pl

Background: ZIKA virus is a human pathogen, spreading with mosquito *Aedes africanus*. It spreads from eastern Africa to Asia, then to Europe and finally to both Americas. During infections of adults, progression of symptoms is usually not severe. Patients have elevated temperature, rash, influenza-like symptoms, except responsibility for Guillain-Barre syndrome. Unfortunately, during infection of pregnant women, ZIKA promotes development of microcephaly in fetuses. Up to date there is no effective therapy of infection available.
Hypothesis: ZIKA virus protease NS3 is the key enzyme responsible for infection of the human cells. There is limited knowledge about the activity of this enzyme. Like similar enzymes from the *flaviviridae* group, enzyme is serine protease with pseudotrypsin activity. Its specificity was estmated by peptide library, but we decided to test its specificity in the assay better reflecting biological environment.
Aim: Estimation of ZIKA NS3 serine protease substrate specificity.
Methodology: We prepared a mix of proteins at MW-s from 15 to 70 kDa, which are routinely analyzed in our laboratory as standards veryfing proper work of our nanoLC-MS/MS systems and added appropriate quantity of recombinant NS3 protease.
Results: We were able to find cleavage sites find after detailed analysis of nanoLC-MS/MS derived results. Our results partially validate previous results received after interaction between peptide library and protease NS3.
Conclusion: Our approach is useful during estimation of the substrate specificity of proteases. The model based on the real protein sequences seems to be better reflecting biological context of the investiated enzyme activity.

Acknowledgments: The work was supported by project no. 2016/21/B/NZ6/01307 financed by the National Science Center, Poland.

Simulation of phase II metabolism to study interactions of metabolites with proteins

P. Mielczarek[1,2], K. Rozmus[1], J. Silberring[1,3]
[1]AGH University of Science and Technology, Faculty of Materials Science and Ceramics, Department of Biochemistry and Neurobiology, Krakow, Poland
[2]Laboratory of Proteomics and Mass Spectrometry, Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland
[3]Centre of Polymer and Carbon Materials, Polish Academy of Sciences, Zabrze, Poland
przemyslaw.mielczarek@agh.edu.pl

Background. Currently the phase II metabolism is mainly studied using liver cells homogenates or liver microsomes. This techniques require advanced separation techniques to be able to identify products of phase II metabolism in complex biological mixtures. Here we present connection of electrochemical oxidation with mass spectrometry detection as an alternative tool to study phase II metabolism and interaction of metabolites with proteins.
Hypothesis. Paracetamol can be electrochemically oxidized into its metabolite NAPQI (*N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine). This metabolite reacts with protein β-lactoglobulin and based on the mass spectrometry the product of this reaction can be specified.
Aim. The aim of the study was to confirm that electrochemical oxidation with mass spectrometry can be a powerful tool to simulate phase II metabolism to study interactions of pharmaceuticals metabolites with proteins.
Methodology. Paracetamol was oxidized by ROXY™ system (Antec, The Nederlands) on glassy carbon working electrode. The electrochemical oxidation product was mixed with β-lactoglobulin as a model protein. The conjugation process was controlled by MALDI mass spectrometry on ultrafleXtreme (Druker Daltonics, Germany). The protein with conjugated metabolite of paracetamol was then reduced, alkylated and digested by trypsin. Finally, the fragment mass spectra were obtained to confirm which amino acid was modified by paracetamol metabolite.
Results. Paracetamol was successfully electrochemically oxidized into its natural metabolite NAPQI with hepatotoxic properties. It was shown that the metabolite of paracetamol reacts with β-lactoglobulin leading into a conjugation product. The cysteine present in the protein sequence responsible for the conjugation process was determined based on fragment mass spectra.
Conclusion. It was shown that electrochemical oxidation with mass spectrometry detection can be an effective tool to study phase II metabolism of pharmaceuticals and interaction of metabolites with proteins.

Acknowledgments. The work was supported by 5th Polish-Taiwanese Joint Research Grant "The possible role of LVV-hemorphin 7 in alcohol dependence and analgesia" (NR PL-TW/V/2/2018)

Protein Extraction from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue. A shotgun Proteomics application

I.E Pralea[1], M. Buse[1], A. Zimța[1], G. Morar-Bolba[2], I. Berindan-Neagoe[1,3,4], C.A Iuga[1,5]

[1]Research center for Advanced Medicine"MedFuture" of University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hatieganu", Cluj-Napoca, România

[2]Department of Medical Oncology, the Oncology Institute "Prof. Dr. Ion Chiricuta", Cluj-Napoca, Romania;

[3]Research Center for Functional Genomics, Biomedicine and Translational Medicine, "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania;

[4]Department of Functional Genomics and Experimental Pathology, the Oncology Institute "Prof. Dr. Ion Chiricuta", Cluj-Napoca, Romania;

[5]Department of Pharmaceutical Analysis,Faculty of Pharmacy of niversity of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hatieganu",Cluj-Napoca, România

iugac@umfcluj.ro

Background. Formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue archives represent an abundant resource of clinically relevant material for biomarker discovery. Moreover, a few standard procedures are applied worldwide for the preparation and storage of these tissues. This offers an advantages in terms of availability, stability for preservation and clinical-pathological information of patient outcome- attributes that makes them a valuable alternative to fresh frozen tissue for biomarker analysis.

Hypothesis. FFPE tissues present a particular challenge for proteomic analysis due to the formalin-induced cross-linking of proteins. Protocols for analyzing FFPE tissues by LC-MS/MS exist, but there is need of standardization of procedures and quality data.

Aim. We performed and optimized an urea based protein extraction of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) breast tissues due to buffer compatibility with liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI MS/MS).

Methodology. Whole slide mounted FFPE tissue sections were deparaffinized and protein extraction was conducted on a randomised pair of serial sections. Optimization trial consisted in using temperature and buffer composition to improve protein extraction and introducing an additional extraction step by bead mill protocol. Analysis of raw data and results was performed with Progenesis QI for proteomics (®Waters).

Results. Results were compared with regard to yield, total protein and peptide identification, missed cleavages and specific modifications. PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) classification system was used to classify the identified proteins based on molecular function, biological process and pathway.

Protein extraction protocol consisted of both temperature and bead mill extraction, which provided a better total protein yield. However, the overall results indicate that the latter step does not provide a significant improvement of number, coverage or type of proteins identified.

Conclusion. Change in composition of the urea based buffer and protein extraction at 95°C for 20 minutes followed by 60°C for 2 hours provided a good protein yield and best protein and peptide detection for the tissue analysed when compared with the original urea/thiourea

protocol extraction. The introduction of the bead mill extraction reduced the overall performance of the extraction method. Dissection of TFFE should be taken into consideration when performing protein extraction.

Acknowledgments. None. No funding to declare.

In vivo determination of the CYP2E1 expression in rat hepatic microsomes after drug administration

M. Smoluch[1], P. Mielczarek[1,2], J.H. Kotlinska[3], J. Silberring[1,4]
[1]AGH University of Science and Technology, Faculty of Materials Science and Ceramics, Department of Biochemistry and Neurobiology, Krakow, Poland.
[2]Laboratory of Proteomics and Mass Spectrometry, Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland
[3]Department of Pharmacology and Pharmacodynamics. Medical University, Lublin, Poland.
[4]Centre of Polymer and Carbon Materials, Polish Academy of Sciences, Zabrze, Poland
smoluch@agh.edu.pl

Background. Drug dependence influences cell functions and their biological pathways, but the processes do not seem to be clear and understood. Global analysis of liver proteome can contribute to the explanation of drugs' influence on the metabolic processes and may help to explain the whole problem.
Hypothesis. The project presents application of Western Blotting in drug addiction with the focus on cytochromes P450 (CYP450), mainly responsible for the metabolic processes in liver. The results will present comparison of an influence of different drugs (amphetamine, morphine and cocaine) on proteins present in liver microsomes.
Aim. The rat liver microsomes were taken from control and drugs-addicted rats, and up- and down regulated proteins were evaluated.
Methodology. Adult male Wistar rats were treated s.c. with either saline (control) or amphetamine, morphine, or cocaine in saline, for 15 days. Liver microsomes were prepared according to a standard protocol. The proteins were divided into up- and down regulated groups, based on LC-MS^n analyses, followed by the Mascot server (Matrix Science) identification, after SDS-PAGE separation. The expression of the selected proteins was determined by Western Blotting and the catalytic activity of cytochromes P450 was also determined.
Results. CYP2E1 protein was chosen from up- and down regulated proteins identified by LC-MS^n and verified by Western Blotting for cytochrome P450 4A10 (CYP4A).
Conclusion. After administration of various drugs (amphetamine, morphine, and cocaine) to the rats, significant changes in liver proteome were observed, also including cytochromes P450 responsible for oxidative metabolism. The expression of CYP2E1 was determined.

Acknowledgments. The authors acknowledge support for this work by 5th Polish-Taiwanese Joint Research Grant NR PL-TW/V/2/2018.

Sex affects homocysteine modification at lysine residue 212 of albumin in mice

M. Sikora[1], *Ł. Marczak*[1], *J. Perła-Kajan*[2], *H. Jakubowski*[2,3]

[1]*Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland*

[2]*Poznan University of Life Sciences, Department of Biochemistry and Biotechnology, Poznań, Poland*

[3]*Rutgers-New Jersey Medical School, International Center from Public Health, Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, Newark NJ, USA*

Introduction: Homocysteine (Hcy) modification of protein lysine residues (KHcy) is linked to heart and brain diseases. However, factors affecting KHcy modifications are not fully understood.

Objectives: Our objective was to examine effects of sex, age, and cystathionine β-synthase (*Cbs*) genotype on K525Hcy and K212Hcy modifications in mouse albumin.

Methods: We developed a LC/MS targeted assay, based on MRM, for quantification of K525Hcy and K212Hcy sites in serum albumin. We studied 1 to 9-months-old *Tg-I278T* $Cbs^{-/-}$ mice (tHcy 272±50 μM) and their *Tg-I278T* $Cbs^{+/-}$ siblings (tHcy 5.0±2.6 μM).

Results: Female (n=20) and male (n=13) $Cbs^{-/-}$ mice had significantly elevated albumin K525Hcy and K212Hcy modifications relative to their $Cbs^{+/-}$ female (n=19) and male (n=17) siblings. Age and tHcy explained 1.8-4.6% and 3.8-7.5% of the variance in K525Hcy and K212Hcy, respectively. Male mice had more K212Hcy in albumin than females ($Cbs^{-/-}$ mice: 5.8±4.2 *vs*. 3.2±1.4 units, P=0.023; $Cbs^{+/-}$ mice: 2.7±0.8 *vs*. 1.9±1.1 units, P=0.008). In contrast, albumin K525Hcy level was similar in males and females, both in $Cbs^{-/-}$ (1.6±1.0 *vs*. 1.4±0.7 units, P=0.54) and $Cbs^{+/-}$ (0.92±0.41 *vs*. 0.87±0.50 units, P=0.514) mice.

Conclusion: These results suggest that the sex-specific K212Hcy modification in albumin plays an important biological function in mice. Other factors that affect KHcy modifications remain to be identified.

Acknowledgments: Supported in part by NCN grants 2015/17/D/NZ5/03444, 2016/23/B/NZ5/00573.

Potential urine biomarkers for prostate cancer identified by label-free nanoLC-MS/MS

S. Kiprijanovska[1], S. Stavridis[2], O. Stankov[2], S. Komina[3], G. Petrusevska[3], K. Davalieva[1]

[1]*Research Centre for Genetic Engineering and Biotechnology "Georgi D Efremov", Macedonian Academy of Sciences and Arts, Skopje, Krste Misirkov 2, 1000 Skopje, R Macedonia*

[2]*University Clinic for Urology, University Clinical Centre "Mother Theresa", 1000 Skopje, R Macedonia*

[3]*Institute of Pathology, Medical Faculty, University "St. Cyril and Methodius", 1000 Skopje, R Macedonia*

e-mail: katarina@manu.edu.mk

Background. Detecting prostate cancer (PCa) still remains a challenge due to the lack of specificity of the currently available tests, especially in patients with less than 10 ng/ml serum PSA.

Hypothesis. The identification of new, preferably noninvasive biomarkers that would detect PCa early and with high sensitivity is quite feasible with the advent of new high-throughput proteomic techniques.

Aim. In this study, we focused on the identification of new biomarkers for PCa in urine with higher specificity and sensitivity from the currently available tests.

Methodology. We compared urine samples from PCa patients (n=5) with Gleason score 7.0±1.2 and 7.5±2.1 (ng/ml) PSA with samples from BPH patients (n=5) with 6.9±1.9 (ng/ml) PSA. A label-free LC-MS/MS was performed on HDMS QTOF (Waters Corp) while comparative statistical analysis was performed with Progenesis QI for Proteomics (V 3.0.3) (Waters Corp).

Results. Statistically significant difference in abundance (BH FDR ≤ 0.05) and fold change of ≥ 1.5, showed 48 proteins (17 up-regulated and 31 down-regulated in PCa). The highest significantly affected biological processes were protein activation cascade (6.23e-5), inflammatory response (2.72e-4) and vesicle-mediated transport (2.72e-4). The protein set also showed significant association with complement and coagulation cascades pathway (8.75e-5). Twenty one proteins are expressed in at least normal prostate or prostate cancer tissue while 8 proteins (AZU1, IGHG1, RNASE2, PZP, REG1A, AMY1A, AMY2A, COL18A1) have not been associated with PCa so far.

Conclusion. We have identified a set of putative diagnostic biomarkers for PCa in urine using high resolution LC-MS. This study represents the starting point for future diagnostic accuracy evaluation of the identified biomarkers.

Acknowledgements. This work was supported by the funds for Science of the Macedonian Academy of Sciences and Arts (grant no. 09-152/1).

Revelation of the IFNα, IL-10, IL-8 and IL-1β as promising biomarkers reflecting immuno-pathological mechanisms in porcine Huntington's disease model

I. Valekova[1], K. Jarkovska[1], E. Kotrcova[1], S. Juhas[1], J.Motlik[1], J. Bucci[2], S.J. Gadher[3], H. Kovarova[1]

[1]Institute of Animal Physiology and Genetics and Research Center PIGMOD, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., 27721 Libechov, Czech Republic

[2] Thermo Fisher Scientific, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008, USA

[3] Thermo Fisher Scientific - Life Science Solutions, 7335 Executive Way, Frederick, Maryland 21704, USA

Huntington's disease (HD) is an inherited neurodegenerative disease with impairment of motor and cognitive functions. Studies in HD gene carriers expressing mutant huntingtin protein (mHTT) demonstrated altered immune response indicating that cytokines may have a significant role in disease development.

We utilized the novel transgenic HD model bearing N-fragment of human mHTT in minipig (Baxa M et al., J Huntington's Dis. 2013, 2:47-68), to investigate central nervous and peripheral cytokine levels. Using Luminex® xMAP™ multiplexing technology and Thermo Fisher Scientific Inc., Swine Cytokine Magnetic 7-plex Panel (InvitrogenTM LSC0001M), the biological fluids were interrogated to identify cytokine alterations related to HD progression. The modelling of interaction networks between such cytokines and HTT facilitated study of intracellular signaling pathways associated with immune response dysregulation.

The most pronounced change was the decline of IFNα in cerebrospinal fluid and secretome of microglial cells (MG). In addition, IL-10 was also lower in the same biological fluids. Elevated levels of pro-inflammatory IL-1 and IL-8 were secreted by MG whilst IL-8 was also increased in serum of transgenic minipigs. The high proportion of mHTT in MG may have a causative impact on cytokine production. A novel role for CREB-binding protein in HD pathogenesis was highlighted.

These findings underlined the roles of IFNα, IL-10, IL-1 and IL-8 in central nervous system inflammation and immune response imbalance in HD progression warrants further investigation into their usefulness in human patients.

Acknowledgements: We thank CHDI, MESY Projects EXAM; CZ.1.05/2.1.00/03.0124, LO1609 and Thermo Fisher Scientific for expertise.

Friday Posters

Ethanol-induced alterations in ubiquitin-proteasome system

A. Antolak[1], A. Bodzon-Kulakowska[1], M. Marszalek-Grabska[2], E. Gibula-Bruzda[2], J.H. Kotlinska[2], P. Suder[1]

[1] Department of Biochemistry and Neurobiology, AGH University of Science and Technology, Cracow, Poland
[2] Department of Pharmacology and Pharmacodynamics, Medical University of Lublin, Lublin, Poland
antolak@agh.edu.pl

Background. Ethanol is a widely abused substance triggering damage to several body organs, primarily the brain and liver. Chronic exposure to alcohol results in dependence and tolerance development especially in the case of youth substance abuse. Identification of molecular pathways that are affected by this substance could enhance understanding of ethanol action at the cellular level. The ubiquitin-proteasome system (UPS) is a proteolytic pathway, which is involved in the regulation of major cellular processes through degradation of abnormal or damaged proteins and also normal proteins of short half-live. Compelling evidence indicates that the UPS plays a role in the molecular changes induced by addictive substances. Proteasome dysfunction has been repeatedly reported in alcoholic liver disease.

Hypothesis. Ethanol evokes long-lasting changes in neuronal circuits and synaptic transmission through the regulation of enzyme activity and gene expression therefore chronic ethanol consumption may directly influence the process responsible for controlled protein degradation in the central nervous system (CNS).

Aim. The objective of these studies was to evaluate protein ubiquitination in brain cortex and spinal cord during alcohol addiction.

Methodology. Male Wistar rats were used for the experiments. Chronic ethanol addiction was evoked by *i.g*. injection of ethanol (5.0 g/kg) between 30th and 50th day of life. Control group received saline (0, 9% NaCl) in the same scheme. Tissue homogenates were separated using 1D electrophoresis and electrotransferred onto the Immuno-Blot® PVDF membrane. Ubiquitinated proteins were detected using Anti-Ubiquitin antibody with colorimetric visualisation.

Results. The study revealed differences in protein ubiquitination in CNS during chronic ethanol exposure.

Conclusion. Global changes in ubiquitination of proteins have wide-ranging consequences for the functioning of the organism. Understanding these regulations will ultimately provide new insight into the pathophysiology of alcoholism. In this work, general ubiquitination profiles of proteins were identified to investigate potential alterations regarding UPS. The obtained data may contribute to explaining the role of altered ubiquitination in organisms exposed to ethanol and the better understanding of addiction mechanism.

Ackowledgments. The work was supported by Dean's Research Grant - project no. 15.11.160.013

Evaluation of circulating angiogenic factors in hepatocellular carcinoma by proteomic technology multiplex array

R. Albulescu [1,2], L.G. Necula[1], A.I. Neagu[1], S. Dima[3], I. Popescu[3] C. Tănase[1],

[1]Titu Maiorescu University, Cajal Institute Bucharest, Romania;

[2]National Institute for Chemical Pharmaceutical Research & Development, Bucharest, Romania;

[3] Center of Excellence in Traslational Medicine, Fundeni Clinical Institute Bucharest, Romania

radu_a1@yahoo.com

Background. Hepatocellular carcinoma (HCC) represents now the third leading cause of cancer deaths worldwide and the incidence and mortality of HCC are increasing; each year, more than half a million people worldwide receive this diagnosis. HCC is an aggressive primary malignancy of the liver predominantly in patients with chronic liver disease and cirrhosis, characterized by inflammation, necrosis and hepatocytes proliferation. This tumor evolves with local expansion, intrahepatic spread, and distant metastases.

Hypothesis. Angiogenesis process has an essential contribution to metastasis and poor prognosis in HCC. Several angiogenic factors have been reported, and some of them are studied as prognostic factors or target molecules of chemotherapeutic drugs. Therefore, identification of new biomarkers of angiogenesis in HCC could contribute to the improvement of HCC patient outcome.

Aim. Our study aims to analyze the expression profile of the main circulating proteins involved in angiogenesis processes in HCC and to established correlation with the disease stage and progression.

Methodology. The study was performed on plasma samples obtained from HCC patients operated in Clinical Fundeni Institute compared to control subjects. Circulating plasma levels of cytokines and growth factors: IFN-gamma, IL-10, IL-12p70, PDGF-AA, IL1-beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, TNFalfa, VEGF-A has been measured by xMAP array technique.

Results. The results obtained from xMAP array showed the overexpression of several plasma growth factors and cytokines involved in angiogenesis processes; this overexpression was positively correlated with advanced stages of disease.

Conclusion. Our findings suggested that selected proteins might be considered valuable candidate biomarkers in cancer staging with potential clinical value for HCC patients.

Acknowledgments. The work was supported by project EEA-JRP-Romania-Norvegia nr.4SEE/30.06.2014.

Expression and purification of stable uniform N^{15} labeled Shiga-like toxin 2 subunit B with application in mass spectrometry-mediated detection of hemolytic-uremic syndrome causing bacteria

V. Tofan, A. Costache, C.Țucureanu, A. Onu
"Cantacuzino" National Military-Medical Institute for Research-Development,Bucharest, Romania
vlad.tofan@cantacuzino.ro

Background. Hemolytic-uremic syndrome is a serious illness, mainly affecting children, frequently caused by Shiga-like toxin 2 producing bacteria. Diagnosis is cumbersome, therefore there is use for more rapid and simple approaches.
Hypothesis. It is proposed that use of tryptic digest of stable uniform N^{15} labeled Shiga-like toxin B subunit 2 (SLT2B) as an internal standard for lysates of suspicious bacterial isolates coupled with detection via MS-MALDI could quickly and confidently provide information concerning diagnosis.
Aim. To optimize the production of different versions SLT2B (N^{14} isotope, N^{15} isotope, polyHis-tagged) by means of bacterial expression and to further purify it. Also, to assess pattern of its tryptic digest.
Methodology. BL21 (DE3) bacterial strain was transformed with SLT2B-containing vectors. For N^{14} variants an autoinducible lactose-based culture medium was used, while for N^{15} variation, the culture medium included $N^{15}H_4Cl$ as singular source of nitrogen. After protein expression, cells were harvested and lysates were processed through multiple purification steps to give yield to purified SLT2B protein. Tryptic digests of SLT2B were analyzed by means Tricine SDS-PAGE and UHPLC-MS-MALDI (Bruker).
Results. SLT2B protein was successfully expressed in both N^{14} and N^{15} forms with or without a polyhistidine tag. Ni-NTA affinity chromatography provided purification for the His-TAG protein, while a combination of ion exchange chromatography and size exclusion chromatography allowed purification when no tag was attached. Trypsinization of the purified proteins was optimized and revealed multiple SLT2B-derived peptides that were subsequently identified through mass spectrometry.
Conclusion. Different versions of SLT2B were produced and multiple purification strategies were tackled in order to evaluate optimal workflows. While tests involving actual bacterial lysates mixed with SLT2B peptides are mandatory, the successful identification of peptides promises a feasible outcome.

Human mesenchymal stem cells migration proteins are upregulated by dihydrotestosterone treatment

M.A. Popa[1], M.C. Mihai[1], A. Constantin[1], V. Şuică[1], R. Costache[2], F. Antohe[1], R.K Dubey[3], M. Simionescu[1]

[1]Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" of the Romanian Academy, Bucharest, Romania

[2]Department of Obstetrics and Gynecology, Clinical Hospital "Dr. Ioan Cantacuzino", 5-7 Ion Movila Str., 020000, Bucharest, Romania

[3]Department for Reproductive Endocrinology, University Hospital Zurich, Wagistrasse 14, 8952 Schlieren and Zurich Center for Integrative Human Physiology (ZIHP), University of Zurich, Switzerland; Switzerland.

Background. Human mesenchymal stem cells (MSC) have been established as valuable candidates for cardiovascular remodeling.

Hypothesis. Based on the facts that adult MSC have the potential to repair/regenerate tissue following cardiac injury, and that androgens (dihydrotestosterone – DHT) influence cells growth and function. We hypothesize that DHT may play a role in the regenerative capability of adult stem /progenitor cells

Aim. To find out whether exposure of MSC to androgens have a beneficial effect on the cell's characteristic functions such as proliferation, viability and migration hence we employed qRT-PCR, Western Blot and mass spectrometry analyses.

Methodology. MSC were isolated from Wharton's jelly. Morphological and functional characterization was made according to "gold standard" protocols. DHT-stimulated cells were analyzed for genic and proteic upregulation expression of factors involved in migration activity. To a more enhanced proteic evaluation we performed also a mass spectrometry analysis for treated cells compared with the non-treated ones.Using specific human primers, we performed a qRT-PCR on ARNm isolated from MSC stimulated for more than 90 hours with 30 nM. Interest genes were normalized against GAPDH. We used specific labeled human antibody to perform a Western Blot analyze of proteins isolated from MSC stimulated in the same condition as above. Target signals were normalized against beta-actin. Following the same pattern of stimulation, we performed a mass spectrometry analysis carried out using the EASY n-LC II system coupled to the LTQ Orbitrap Velos Pro mass spectrometer (Thermo Scientific, California, USA). The bioinformatics analysis comprised database protein inference, relative quantification and Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathways over-representation and revealed proteins that participate in actin cytoskeleton rearrangement processes.

Results. The following novel findings were revealed by our experiments with MSCs: (a) DHT modulated *EMMPRIN*, *MMP2* and *MMP9* gene expression; to find out whether DHT affects the gene expression of ARs and of other molecules implicated in cell migration, cultured MSC were exposed to the hormone (30 nM) and then subjected to qRT-PCR assay. The experiments revealed that DHT induced a significant up-regulation of the mRNA for AR and of the molecules involved in cell migration, EMMPRIN and MMP-9; DHT had no effect on MMP-2 gene expression.

(b) DHT modulated *EMMPRIN*, *MMP2* and *MMP9* proteic level; we found that the secretion of MMPs is increased significantly in DHT-treated MSC, and this effect was specifically

enhanced in the presence of heart slices. These results suggest the possibility that factors generated by ischemic tissue stimulates MSC to increase the MMPs production, and this response supports the proteolytic activity, which is essential for clearing damaged scar tissue so as to facilitate MSC integration and tissue repair. Taken together the above findings suggest that DHT potentiates the integration of MSC into cardiac tissue and thus, may positively influence the repair process.

(c) Up-regulation of actin cytoskeleton in DHT-treated MSC; the relative quantification experiments were based on precursor ion alignment and intensity comparison between the DHT-treated and the control MSC. A coefficient of variation of <30% was allowed between technical replicates. The total ion chromatogram normalization method resulted in 869 proteins that are differentially expressed following the treatment with DHT. A supplementary filtration, allowing only the proteins quantified with at least 2 peptides/protein was chosen for further bioinformatics analysis. This resulted in a list of 258 proteins with spectral abundance alteration of at least 1.5-fold (DHT treatment/control samples) and statistical significance. Amongst them, *four* proteins which presented very high identification confidence (Mascot score>9000) and significant spectral alteration levels were found to be part of a key cell motility-signaling map, the regulation of *actin cytoskeleton* (KEGG entry hsa04810). This pathway was found to be statistically over-represented, after the implementation of a further significance correction, which was based on the false discovery rate algorithm (FDR p-value: 1.96E-2).

Conclusions The presence of DHT primed MSC to a probable migration effect. Therefore, all the data obtained by stimulating the stem cells with DHT can be used further on migration studies.

Acknowledgements. This work was supported by Swiss-Romanian Research Programme SNSF, grant no. IZERZO-142213/1 and Romanian Academy

Improved metabolic status in obese type 2 diabetic patients treated by sleeve gastrectomy is associated with increased circulating microRNA-126

A.Constantin[1], M.Nemecz[1], M.Dumitrescu[1], A.Filippi[1], N.Alexandru[1], B.Smeu[2], L.Petcu[3], A.Georgescu[1], G.Tanko[1], C. Copaescu[2], M.Simionescu[1]

[1]*Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" of the Romanian Academy, Bucharest, Romania*

[2]*Ponderas Academic Hospital, Bucharest, Romania*

[3]*Institute of Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases "Prof. Dr N. Paulescu", Bucharest, Romania*

alina.constantin@icbp.ro

Background. Diabetes-related stimuli were reported to alter the expression of circulating microRNAs (miRNAs). Although metabolic surgery is commonly considered effective for obese type 2 diabetes (O-T2D) patients, little is known about the underlying mechanisms.

Objectives. To determine whether the O-T2D patients undergoing metabolic surgery exhibit changes in the level of circulating miRNAs, and to examine the modifications associated with their improved metabolic status.

Methodology. Blood samples were taken from 14 fasting O-T2D patients before and 1 year after sleeve gastrectomy (SG). Markers indicative of surgical response (glycaemic parameters, lipid profile, adipokine and gastrointestinal hormones) were evaluated. Circulating miR-126, miR-132, and miR-204 levels were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction and normalized to synthetic cel-miR-39.

Results. One year after SG, the patients exhibited a substantial amelioration of the metabolic parameters: a significant decrease in plasma glucose, insulin, triglycerides, and leptin, and an increase in circulating adiponectin. Circulating miR-132 and miR-204 had similar expression levels before and after SG. Conversely, circulating miR-126 increased significantly (p=0.001) and this change correlated negatively with the metabolic parameters, and with the improvement of homeostasis model assessment of β-cell function (HOMA-β).

Conclusion. One year after sleeve gastrectomy the obese T2D patients exhibited a significant metabolic improvement associated with an increase in circulating miR-126. Since the latter reportedly participates in the maintenance of vascular homeostasis, our data propose miR-126 as a reliable biomarker and an indicator of improved vascular function after metabolic surgery.

Acknowledgments. This work was supported by grants from the Romanian National Authority for Scientific Research, CNCS-UEFISCDI, project PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0527 and project PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0797, and the Romanian Academy.

Sera from obese type 2 diabetes patients undergoing metabolic surgery instead of conventional therapy exert beneficial effects on beta cell survival and function

G.Tanko[1], A.Constantin[1], M.Dumitrescu[1], M.Nemecz[1], A.Picu[3], B.Smeu[2], C.Guja[3], N.Alexandru[1], A.Georgescu[1], M.Simionescu[1]

[1]*Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" of the Romanian Academy, Bucharest, Romania*

[2]*Ponderas Academic Hospital, Bucharest, Romania*

[3]*Institute of Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases "Prof. Dr N. Paulescu", Bucharest, Romania*

gabriela.tanko@icbp.ro

Background. Pancreatic beta cells are highly sensitive to oxidative and endoplasmic reticulum (ER) stress, commonly occurring in type 2 diabetes (T2D) and obesity.

Objectives. We aimed at investigating the cellular responses of human beta cells exposed to sera from obese T2D patients treated differently, namely by conventional therapy or laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG).

Methodology. Serum samples from obese T2D men randomized to conventional treatment or LSG were taken at baseline and 6 months later. After exposing 1.1B4 cells to study patients' sera, the following were assessed: cellular viability and proliferation (by MTT and xCELLigence assays), reactive oxygen species (ROS) production (with DCFH-DA), and expression of ER stress markers, oxidative- or autophagy-related proteins and insulin (by real-time PCR and Western blot).

Results. At 6-month follow-up, the participants undergoing LSG achieved an adequate glycaemic control, whereas conventionally-treated patients did not. As compared to 1.1B4 cells incubated with baseline sera (set as controls), cells exposed to sera from LSG-treated patients exhibited: (i) increased viability and proliferation ($p < 0.05$); (ii) diminished levels of ROS and p53 ($p < 0.05$); (iii) enhanced protein expression of autophagy-related SIRT1 and p62/SQSTM1 ($p < 0.05$); (iv) significantly decreased transcript levels of ER stress markers; and (v) augmented insulin expression ($p < 0.05$). Conversely, the 6-month conventional therapy appeared not to impact on circulating redox status. Moreover, 1.1B4 cells exposed to sera from conventionally-treated patients experienced mild ER stress.

Conclusion. Circulating factors in patients with improved diabetes after metabolic surgery exerted favourable effects on beta cell function and survival. These results may facilitate the design of future strategies targeted to protect beta cells and optimize the treatment of type 2 diabetes.

Acknowledgments. This study was supported by the Romanian Academy, and the Romanian National Authority for Scientific Research, CNCS-UEFISCDI through the projects PN-II-PT-PCCA-2013-4-2154, PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0797, PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0527.

Evaluation of the early and progressive changes in plasma, hemodynamic and cardiac parameters in an animal model of atherosclerosis-associated diabetes mellitus

A. Filippi[1], N. Alexandru[1], G. Voicu[1], C. A. Constantinescu[1], D. Rebleanu[1], M. Fenyo[1], D. Simionescu[2], A. Simionescu[2], I. Mânduţeanu[1], A. Georgescu

[1]*Institute of Cellular Biology and Pathology "N. Simionescu" of Romanian Academy, Bucharest, Romania*
[2]*Clemson University, USA*

alexandru.filippi@icbp.ro

Background. Diabetes appears to contribute directly to the development of cardiovascular disorders including heart valve disease.

Hypothesis. Identification of distinct changes associated with diabetes occurring in the valve may lead to the targeting of these major events using appropriate therapies as a treatment for valvular diseases.

Aim. To evaluate the early and progressive changes in plasma, hemodynamic and cardiac parameters in vivo, and to establish causal associations among them in atherosclerosis-associated diabetes mellitus.

Methodology. The streptozotocin-induced diabetic apolipoprotein E-deficient mouse model maintained on a high-fat cholesterol-rich diet was used. The blood was collected at 1, 2, 4 and 8 weeks from the last streptozotocin injection. To assess the structural and functional aspects of aortic valve, aortic arch and left ventricle, echocardiography-based in vivo imaging was applied.

Results. Important increases of plasma glucose, cholesterol, LDL/HDL cholesterol, triglyceride and fetuin-A concentrations occurred just from the first week of diabetes. These caused early impairments in structure and function of: (1) aortic valve: thickness, calcification, increases of velocity time integral and transvalvular velocity and reduction of aortic cusp separation; (2) aortic arch: arterial wall thickness, greater aortic pulse wave velocity and lower distensibility; (3) left ventricle: shortening fraction and mass increases. Longer diet and treatment times did not induce more spectacular changes in the cardio-biochemical parameters.

Conclusion. Our study demonstrates abnormalities of cardiac structure and function despite the short duration of diabetes, highlights the potential high cardiovascular risk occurring in diabetes and provides new possible biomarkers and targets for cardiac-valvular disease.

Acknowledgments. The work was supported by: grant of the Romanian National Authority for Scientific Research, CNCS-UEFISCDI, project no. PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0527; grant from the Competitiveness Operational Program 2014-2020, Targeted therapies for aortic valve disease in diabetes, THERAVALDIS, ID P_37_298, MySMIS code: 104362, contract number 115/13.09.2016; and Romanian Academy.

3D model to study human aortic valve disease

E. Butoi[1], *S. Cecoltan*[1], *L. Ciortan*[1], *R.D. Macarie*[1], *M.M. Tucureanu*[1], *M. Vadana*[1], *I.Droc*[2], *A. Simionescu*[1], *I. Mânduţeanu*[1]

[1]*Institute of Cellular Biology and Pathology "N. Simionescu" of Romanian Academy, Bucharest, Romania*

[2]*Army's Clinic Center for Cardiovascular Diseases, Bucharest, Romania*

elena.dragomir@icbp.ro

Background. Calcific aortic valve disease (CAVD) is the third leading cause of cardiovascular disease being a progressive process, with initial valvular endothelium inflammation, followed by fibrotic thickening and extensive calcification of the valve leaflets. Currently, pharmacological interventions for slowing down the disease progression are unavailable and there are no physiologically suitable models for human CAVD.

Hypothesis. 3D models of human aortic valve may help to advance the understanding of the cellular and molecular mechanisms of human CAVD.

Aim. To obtain a 3D platform with structure similar with the human aortic valve leaflet to study valvular cells phenotypic changes relevant for human CAVD.

Methodology. Human valvular interstitial cells (VIC) were encapsulated in a Gel-MA hydrogel at a density of $2x10^6$/ml. 3D-constructs resulted from 100µl cell-laden hydrogel were crosslinked by exposure to UV light in a bioprinter (RegenHu). Valvular endothelial cells (VEC) were seeded on the construct surface. The constructs were maintained in culture for 7-21 days. Cell viability was determined using Live/Dead and cell phenotype was analyzed by Real Time-PCR and immunohistochemistry using specific primers and antibodies.

Results. In the current study, we obtained a 3D construct with human VIC inside and a VEC layer on the top. Encapsulated VIC developed a well-defined cell network within construct and express low levels of alpha-smooth muscle actin (α-SMA) compared with VIC in bi-dimensional culture. The Real-Time PCR data indicated that encapsulated VICs have a less activated phenotype than those grown in bi-dimensional culture. VEC seeded on the constructs adhere, proliferate and form a monolayer at surface of the construct exhibiting endothelial specific markers: PECAM-1 and von Willebrand factor.

Conclusion. We have developed 3D constructs with structure similar to human valve leaflet, with viable VIC encapsulated in constructs and VEC on the surface. The 3D model will help for further investigations of the dynamic interaction between valve interstitial and endothelial cells, in order to study the valvular disease progression and to develop potential therapeutic interventions.

Acknowledgments. The work was supported by project no. Competitiveness Operational Program 2014-2020, Targeted therapies for aortic valve disease in diabetes, THERAVALDIS, ID P_37_298, MySMIS code: 104362, contract number 115/13.09.2016.

Characterization of senescent versus early passages human amniotic fluid stem cells

F. Iordache[1], D. Alexandru[1], A. Georgescu[1], R. Airini[2], B. Amuzescu[2], L. Savu[3], H. Maniu[1]

Institute of Cellular Biology and Pathology N. Simionescu of Romanian Academy, Bucharest, Romania

[2]University of Bucharest, Faculty of Biology, Bucharest, Romania

[3]S.C Genetic Lab S.R.L., Bucharest, Romania

florin.iordache@icbp.ro

Background. Senescence represents an adaptive cellular response to potentially stress. Although to date there is no unique marker to distinguish senescent cells from non-proliferating ones, a combination of markers can lead us to a senescent phenotype called senescence-associated secretory phenotype (SASP), consisting in a number of metabolic changes that try to remove stress factors.

Aim. The present study aims to explore activation of specific signaling molecules associated with SASP in our *in vitro* senescence model.

Methodology. Human amniotic fluid stem cells (AFSC) at passages 2 or 3 and senescent cells (maintained 40 days in culture without any passage) were analyzed for modification of stem cell markers by flow cytometry, for inflammatory markers by qRT-PCR and for ion currents by patch-clamp.

Results. Senescent AFSC were positively stained for SA-β-Gal as compared with early passages AFSC. The expression of surface markers decreased in senescent AFSC by 4 to 65% compared to early passages AFSC, as follows: CD29 by 43.6%, CD31 by 49.2%, CD44 by 75.5%, CD49e by 65.3%, CD54 by 1.8%, CD56 by 62.5%, CD73 by 82.3%, CD90 by 60.7%, CD105 by 65.5%, CD146 by 30.4%, respectively. Senescent AFSC featured increased expression of IL-1α, IL-6, IL-8, TGFβ, NF-βB (p65), suggesting a SASP. Via patch-clamp we identified 5 ion current components: K+ outward rectifier current, big conductance K+ channels (BK) current fluctuations, Na+ current, inward rectifier K+ current, and transient receptor potential (TRP)M7-like current.

Conclusion. In conclusion, in our model we evidenced specific changes in senescent vs. early passages AFSC, suggesting a shift from an anti-inflammatory phenotype to a proinflammatory one, thus limiting their therapeutic potential.

Acknowledgments. The work was supported by project nr. 19/2018, PN-III-P1-1.1-PD-2016-1660 financed by the he Executive Agency for Higher Education, Research, Development and Innovation Funding (UEFISCDI).

The mechanisms underlying protective effects of oleic acid against palmitic acid on pancreatic beta cell function

M. Nemecz, G. Tanko, A. Constantin, M. Dumitrescu, N. Alexandru, A. Fillipi, M. Simionescu, A. Georgescu
Institute of Cellular Biology and Pathology 'N.Simionescu of Romanian Academy, Bucharest, Romania
miruna.nemecz@icbp.ro

Background. Glucose and free fatty acids, the two main nutrients in energy metabolism in most organisms, are of particular interest in beta cell equilibrium.
Hypothesis. Palmitic acid, one of the most common saturated fatty acids has been shown to induce lipotoxicity in the pancreatic beta cells; however, the potential signaling intermediates have not been fully detected.
Aim. In this study, we aimed at identifying the mechanisms underlying the different effects of palmitic acid and oleic acid on human pancreatic beta cell function. To address this issue, the oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, inflammation, apoptosis and their mediator molecules were investigated in the insulin releasing 1.1B4 beta cells exposed to palmitic and/or oleic acid.
Methodology. Cultured 1.1B4 beta cells were incubated for 24 h in the absence/ presence of 250μM oleic acid, palmitic acid or the combination of both free fatty acids and physiologically glucose concentrations.
Results. We found that, oleic acid promoted neutral lipid accumulation and insulin secretion, whereas palmitic acid was poorly incorporated into triglyceride and it did not stimulate insulin secretion from human pancreatic islets. In addition, palmitic acid caused **(1)** oxidative stress through a mechanism involving increases in ROS production and MMP-2 protein expression/gelatinolytic activity; **(2)** endoplasmic reticulum stress by up-regulation of chaperone BiP and unfolded protein response (UPR) transcription factors (ATF6, XBP-1) and by PTP1B down-regulation in both mRNA and protein levels; **(3)** inflammation through enhanced synthesis of proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8); and **(4)** apoptosis by enforced expression of CHOP multifunctional transcription factor. Oleic acid alone had opposite effects due to its different capacity of controlling these pathways, in particular by SOD2 and PTP1B overexpression and reduction of the MMP-2 expression/activity, UPR transcription factors, and proinflammatory cytokines.
Conclusion. Our findings show the protective action of oleic acid against palmitic acid on beta cell lipotoxicity through promotion of triglyceride accumulation and insulin secretion and regulation of effector molecules involved in oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, inflammation and apoptosis.

Acknowledgments. Work supported by grants of the Romanian National Authority for Scientific Research, CNCS-UEFISCDI, project no. PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0527, project no. PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0797, and by the Romanian Academy.

Inhibition of miR-486 and miR-92a decreases liver and plasma cholesterol levels by modulating lipid-related genes in hyperlipidemic hamsters

L. S. Niculescu, N. Simionescu, E. V. Fuior, C. S. Stancu, M. G. Carnuta, M. D. Dulceanu, M. Răileanu, E. Drăgan, A. V. Sima

Lipidomics Department, Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" of the Romanian Academy, Bucharest, Romania

loredan.niculescu@icbp.ro

Background. MicroRNAs (miRNAs) are potent post-transcriptional gene regulators, known to modulate genes involved in lipid metabolism. Therefore, identifying the target genes of miRNAs involved in dyslipidemia and cellular dysfunction is important.

Hypothesis. Modulation of miRNA expression might ameliorate hyperlipidemia *in vivo*.

Aim. To evaluate the potential of *in vivo* inhibition of miR-486 and miR-92a to reverse hyperlipidemia, then to identify and validate their lipid metabolism-related target genes.

Methodology. Male Golden-Syrian hamsters fed a hyperlipidemic (HL) diet (standard chow plus 3% cholesterol and 15% butter, 10 weeks) were injected subcutaneously with lock-nucleic acid (LNA) inhibitors for miR-486 or miR-92a. Lipids and miRNAs levels in liver and plasma, and hepatic expression of miRNAs target genes were assessed in all HL hamsters.

Results. MiR-486 and miR-92a target genes were identified by miRWalk analysis and validated by 3′UTR cloning in pmirGLO vectors. HL hamsters had increased liver (2.8-fold) and plasma (2-fold) miR-486 levels, and increased miR-92a (2.8-fold and 1.8-fold, respectively) compared to normolipidemic (NL) hamsters. After 2 weeks treatment, liver and plasma cholesterol levels decreased (23% and 17.5% for anti-miR-486, 16% and 22% for miR-92a inhibition). Hepatic triglycerides and non-esterified fatty acids content decreased also significantly. Bioinformatics analysis and 3′UTR cloning in pmirGLO vector showed that Sterol O-Acyltransferase-2 (SOAT2) and Sterol-Regulatory Element Binding Transcription Factor-1 (SREBF1) are targeted by miR-486, while ATP-binding cassette G4 (ABCG4) and Niemann-Pick C1 (NPC1) by miR-92a. In HL livers and in cultured HepG2 cells, miR-486 inhibition restored the levels of SOAT2 and SREBF1 expression, while anti-miR-92a restored ABCG4, NPC1 and SOAT2 expression compared to scrambled-treated HL hamsters or cultured cells.

Conclusion. *In vivo* inhibition of miR-486 and miR-92a could be a useful and valuable new approach to correct lipid metabolism dysregulation.

Acknowledgements. This work was supported by the Romanian Academy and the Romanian National Authority for Scientific Research and Innovation, CNCS-UEFISCDI (grant number PN-II-RU-TE-2014-4-0290).

Novel molecular mechanisms by which ginger extract reduces the inflammatory stress in TNFα – activated human endothelial cells; decrease of Ninjurin-1, TNFR1 and NADPH oxidase subunits expression

L. Toma[1], M. Raileanu[1], M. Deleanu[1,2], C. S. Stancu[1], A.V. Sima[1].
1 Lipidomics Department, Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" of the Romanian Academy, Bucharest, Romania
2 Faculty of Biotechnology, University of Agronomical Sciences and Veterinary Medicine, Bucharest, Romania
laura.toma@icbp.ro

Background. Atherosclerosis is an inflammatory disease characterized by the formation of atherosclerotic plaques in the vessel wall of the large and medium arteries. A pivotal event in atherogenesis is the activation of endothelial cells (EC) which express pro-inflammatory cytokines and cell adhesion molecules that mediate the recruitment of monocytes from circulation in the sub-endothelial space. Published data provide strong evidence that many phytochemicals found in plants may be used to prevent or treat chronic diseases.
Hypothesis. Ginger extract (GEx) can attenuate atherosclerosis progression by ameliorating the dysfunction of human endothelial cells (HEC).
Aim. To investigate the potential of GEx and its' main active components 6-gingerol (6-G) and 6-shogaol (6-Sh) to decrease inflammatory stress in HEC and to identify new mechanisms of action of ginger against atherosclerosis.
Methodology. Cultured endothelial cells (EA.hy925) were exposed for 18h to 15ng/ml TNFα in the presence/absence of 10μM GEx, 6-gingerol (6-G) or 6-shogaol (6-Sh). The inflammatory stress was evaluated by measuring the expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and vascular cell adhesion molecule 1(VCAM-1), and the rate of adhesion of monocytes to HEC. To identify the mechanisms of action of GEx, 6-G or 6-Sh, the expression of Ninj-1, TNFα receptor 1 (TNFR-1), receptor for advanced glycation end-products (RAGE), soluble RAGE (sRAGE), NOX4, p22phox, HO-1, intracellular ROS levels, NF-kB activation and Nrf2 translocation were evaluated.
Results. GEx decreases MCP-1 and VCAM-1 expression and monocyte adhesion to HEC. This decrease was associated with the: (1) decrease of ninjurin-1 expression; (2) reduction of TNFR-1 and of RAGE, in parallel with the increase of sRAGE; (3) decrease of intracellular ROS levels and of NADPH oxidase subunits expression; (4) activation of antioxidant Nrf2 and HO-1, and (5) inhibition of NF-kB. The benefic effects of 6-G and 6-Sh were weaker than those of GEx (GEx>6-Sh>6-G).
Conclusion. GEx might be a promising alternative to ameliorate disorders in which oxidative stress and inflammation are important.

Acknowledgements. The present work was supported by the Romanian Academy.

Bisphenol A down-regulates apolipoprotein A1 expression and exerts pro-atherogenic effects

V.G. Truşcă, M. Dumitrescu, I.M. Fenyo,I.F. Tudorache, A.V. Gafencu
Institute of Cellular Biology and Pathology "N. Simionescu" of Romanian Academy, Bucharest, Romania
violeta.trusca@icbp.ro

Background. Bisphenol A (BPA) is found in polycarbonate plastics, which are often used in containers that store food and beverages. The mechanism of pro-atherogenic effects of BPA is unclear. Apolipoprotein A1 (apoA1) is the main component of high-density lipoprotein (HDL), the lipoprotein with anti-atherosclerotic properties.
Hypothesis. Bisphenol A exposure having effects on apoAI gene expression may accelerate atherosclerosis.
Aim. Here we investigated whether BPA affects apoAI gene expression in hepatocytes, and thus disturbing the structure and functionality of HDL.
Methodology. ApoA1 gene expression was determined by RT-PCR. The capacity of BPA to modulate apoA1 promoter activity was assessed by transient transfections. NF-kB binding to apoA1 promoter was tested by chromatin immunoprecipitation and protein-DNA interaction assays. The effect of BPA on atheromatous plaque development was assessed in LDLR-/- (LDL Receptor deficient) mice fed a high-fat diet and treated with 50 μg BPA/kg body weight by gavage for two months. Aortic atherosclerotic lesions were evaluated by Oil red O staining and quantified by ImageJ software.
Results. Our data showed that BPA decreases apoA1 expression in hepatocytes. Chromatin immunoprecipitation and protein-DNA interaction assays demonstrated that BPA induces NF-kB binding to apoA1 promoter in hepatocytes. Analysis of apoA1 promoter revealed the presence of six NF-kB binding sites in the region -1223/-252 of apoA1 promoter. Plasma cholesterol and triglyceride levels were significantly higher compared to those in the control group, in which only the vehicle was administered. Convergently, HDL level was decreased by BPA treatment of LDLR-/- mice. Moreover, atherosclerotic lesions in the aortas of the BPA-treated LDLR-/- mice were more developed in BPA treated mice as compared to the controls.
Conclusion. BPA exerts its pro-atherogenic effects through NF-kB activation and down-regulation of apoA1 expression in hepatocytes. Identifying the mechanism of pro-atherogenic effects of BPA is critical for developing novel treatment strategies for atherosclerosis.

Acknowledgments. This work was supported by CNCS – UEFISCDI (PN-II-RU-TE-2014-4-2660, PN-III-P1-1.1-PD-2016, P4 PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697 within PNCD III) and Romanian Academy.

Mass Spectrometry evidence for modified protein composition of pulmonary lipid rafts in experimental diabetes

E. Uyy, V.I. Şuică, R.M. Boteanu, L. Ivan, F. Antohe, M. Simionescu
Institute of Cellular Biology and Pathology "N. Simionescu" of Romanian Academy, Bucharest, Romania
elena.uyy@icbp.ro

Background. Diabetes and the associated hyperglycemia affect pulmonary physiology and biochemistry inducing endothelial impairment, as the first step in lung vascular dysfunction. Lipid rafts are claimed to be actively involved in signal transduction, cholesterol homeostasis, and vesicular trafficking.

Hypothesis. The present study aimed to determine whether lipid raft proteome could be involved in the onset of diabetic state in the pulmonary tissue.

Aim. To document the effect of hyperglycemia on lung endothelial cells, we designed experiments on streptozotocin-induced diabetes and on double transgenic diabetic mice to investigate: (1) the early morphological changes occurring in endothelial cells, (2) the ACE activity and cholesterol content of lipid rafts, and (3) the relative quantification of the significantly changed lipid raft protein composition.

Methodology. Biochemical assays, electron microscopy and LC-MS/MS analysis were performed on detergent resistant membrane (lipid rafts) microdomains isolated from the lungs of diabetic and non-diabetic mice models.

Results. Electron microscopy results showed a well-developed synthesis apparatus in diabetes, demonstrating a high metabolic activity. LC-MS/MS analysis revealed that hyperglycemia has a modulatory effect on the expression of 178 proteins that co-fractionated with lipid rafts. These proteins were found to be implicated in 13 statistically significant over-represented signaling pathways.

Conclusion. In diabetic lung, the endothelial cells exhibit both structural and biochemical modifications accompanied by enhanced cholesterol content and ACE enzymatic activity. In adition the mass spectrometry showed a modified expression of caveolin-1, alarmins, ribosomal and junctions proteins associated with lipid rafts. This may point out toward a possible novel regulatory pathways in the mechanism of microangiopathy installation modulated by the lipid rafts composition in the diabetic lung.

Acknowledgments. The present work was supported by the Romanian Academy and Ministry of Research and Innovation Grant UEFISCDI no.41/2018

Dermal fibroblasts as new players in regenerative therapy

A.M. Roşca[1], V.Pruna[1], R.Tutuianu[1], T.P. Neagu[2], I. Lascar[2], M. Simionescu[1], I. Titorencu[1]

[1]*Institute of Cellular Biology and Pathology "N. Simionescu" of Romanian Academy, Bucharest, Romania*

[2]*University of Medicine and Pharmacy "Carol Davila", Bucharest, Romania*

ana-maria.rosca@icbp.ro

Background. Mesenchymal stromal cells (MSCs) represent one of the pillars of regenerative medicine. Stromal cells meeting the minimal requested characteristics of stem cells have been isolated from various sources, from which bone-marrow (BM) and adipose tissue (AD) remaining the most studied. However these sources provide little starting material, and require invasive extraction means, while fibroblasts are easily harvested in large numbers from various biological wastes.

Hypothesis. Fibroblasts could be an alternative to MSCs in regenerative therapies and dermal fibroblasts (DFs) are relative easy to isolate procedure and highly available.

Aim. To determine the phenotypic profile and trilineage differentiation potential of dermal fibroblasts comparative to BM and AD derived MSCs (BM-MSCs and ADSCs).

Methodology. BM-MSCs were isolated from BM aspirate, DFs and ADSCs were isolated by the explant method, and enzymatic digestion respectively. Cells were analyzed by flow citometry for CD73, CD90, CD105, CD45, CD34, CD11b, CD79a and HLA-DR. The trilineage differentiation (adipogenic, osteogenic and chondrogenic) was induced by cultivating the cells in specific media for 3 weeks, followed by fixation and corresponding staining: Oil Red, alkaline phosphatase/von Kossa and Alcian Blue.

Results. All the tested cells were positive for CD73, CD90, and CD105; negative for CD45, CD34, CD11b, CD79a and HLA-DR. Thus 97.7 ± 3.3 % of BM-MSCs, 98.8 ± 0.11% of ADSC and 99.5 ± 0.47% of DFs were positive for CD73, 98.8 ± 0.7 % of BM-MSCs, 98 ± 1.14% of ADSCs and 97.6 ± 3.2 % of DFs were positive for CD90 and 88.95 ± 2.2 % of BM-MSCs, 94.2 ± 6.9 % of ADSC and 92.4 ± 7.1 % of DFs were positive for CD105. The results showed that all tested cells types were able to differentiate towards adipogenic and chondrogenic. Regarding the osteogenic differentiation only BM-MSCs and ADSCs produced the calcification nodules, while the FDs were only positive for alkaline phosphatase.

Conclusion. Here, we demonstrate that FDs display the identical phenotype as classical progenitor cells (BM-MSCs and ADSCs). Moreover, FDs had a multilineage differentiation potential similar to BM-MSCs and ADSCs**.** Taken together, these data indicate FDs as promising players in regenerative medicine.

Acknowledgments. The work was supported by PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0749, PN-III-P1-1.1-TE-2016-1592 and the Romanian Academy.

Exploration of mechanisms leading to plaque instability in a rabbit atherosclerotic model – preliminary data

L. Ivan[1], *E. Uyy*[1], *R.M. Boteanu*[1], *V.I. Şuică*[1], *C. Coman*[2], *S. Berg*[3], *R. Hansen*[3], *F. Antohe*[1]

[1]*Institute of Cellular Biology and Pathology "N. Simionescu" of Romanian Academy, Bucharest, Romania*

[2]*INCDMM "Cantacuzino", Bucharest, Romania*

[3]*SINTEF Technology and Society, Trondheim, Norway*

luminita.radulescu@icbp.ro

Background. Atherosclerosis is a lipoprotein-driven disease that leads to plaque formation at specific sites of the arterial tree through intimal inflammation, fibrosis, necrosis, and calcification. Sometimes such plaques may suddenly cause life-threatening coronary thrombosis clinically described as acute coronary syndrome.

Hypothesis. An atherosclerotic rabbit model, with a lipoprotein metabolism similar to the human patient, have been proposed to explore the mechanisms leading to plaque instability. We expect to identify an unambiguous alarmin expression pattern, associated to specific atherogenic signalling pathways that may explain the residual risk of cardiovascular-related events and associated mortality.

Aim. The project will explore the plaque instability and the early signs of risks and/or protective factors in coronary disease by using an experimental design comprising both the classical pharmacology (statin administration) and the newest generation of molecular biology approaches (RNA silencing or biological active agents such as PCSK9 antibodies). In preliminary studies the hypercholesterolemic food concentration and treatment to be used was evaluated.

Methodology. Adult male New Zeeland White rabbits (16 weeks-old) were randomly split into 5 groups: two animals were fed a diet containing either 0.5% or 1% high cholesterol diet and three animals were fed a standard diet together with inhibition of PCSK9 for 4 weeks. The inhibition of PCSK9 were obtained either with siRNA (molecule I or II) or using monoclonal antibodies against PCSK9 (Evolocumab, Repatha, AMGEN). Total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL), triglyceride levels were measured by using Dialab kits. Levels of PCSK9 protein in plasma samples were detected by ELISA kit. The presence and the quantification of atherosclerotic lesions were assessed by Oil Red O and hematoxylin and eosin staining.

Results. The hypercholesterolemic diet induces a significant increase in lipid parameters in the plasma. In the present study, we found that irrespective of the cholesterol concentration diet the atherosclerotic plaques had more macrophage accumulation in the aortic lesion area and higher expression of α-smooth muscle actin and CD31 endothelial specific antigen were detected than in the animals fed a standard diet. The administration of anti PCSK9 antibody showed a decrease of the plasma PCSK9 protein in the treated animals.

Conclusion. The preliminary results suggest that hypercholesterolemic diet induces atherosclerotic plaque progression in rabbit model and for more advanced lesions, the 0.5% cholesterol diet will be extended to 12 weeks. The inhibition with anti PCSK9 demonstrated

to be functioning in the decreasing of LDL plasma and could be successfully used in the proposed study.

Acknowledgments. The work was supported by the Romanian Academy and Ministry of Research and Innovation grant UEFISCI no. 41/2018.

The effects of photocatalytic silver (Ag)-titanium dioxide (TiO2) nanoparticles on human lung epithelial cells

D. Rebleanu[1], C.A. Constantinescu[1], G. Voicu[1], M. Deleanu[1], C. Gaidau[2], M. Ignat[2], A. Petica[2], M. Călin[1]

[1] Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" of Romanian Academy, Bucharest, Romania;

[2]R&D National Institute for Textiles and Leather (INCDTP)–Leather and Footwear Research Institute (ICPI) Division, Bucharest, Romania

daniela.rebleanu@icbp.ro

Background. The potential human health risks following the exposure to inorganic nanoparticles (NPs) is a very important issue for their application in leather finishing industry.
Aim. To investigate the effect of Ag/TiO_2 and $Ag/N\text{-}TiO_2$ NPs on human lung epithelial cells.
Methodology. Three formulations of photocatalytic NPs containing 0.53% Ag (Ag/TiO2: NP1), 1.14% Ag (Ag/TiO2: NP2) and 1.62% Ag (Ag/N-TiO2: NP3) were prepared by electrochemical deposition of Ag on the surface of TiO2 and N-TiO2 NPs and further characterized for size and zeta potential. Epithelial lung cells (A549 cells) were exposed for 24 hours to various Ag/TiO2 and Ag/N-TiO2 concentrations and cytotoxicity, cell death mechanisms, production of reactive oxygen species (ROS), the changes in activation/inactivation of p38 MAPK, JNK and ERK signaling pathways and the profile of inflammatory cytokine/chemokine were determined.
Results. A549 cells show differential sensitivity to various concentrations of each NPs formulations. Thus, NP1 and NP3 are more cyto-friendly as compared to NP2. A significant increase (up to 5 folds) in ROS production by A549 cells, that was dependent on dose and NPs formulation, was determined. In addition, no significative effect on total or phosphorylated level of protein p38 MAPK and JNK was observed, irrespective of NPs' formulation. NP2 formulation induces an increase in total and phosphorylated level of ERK1/2 in lung epithelial cells at a concentration of 0.3 mg/ml. NP3 formulation does not induce the expression of highly pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-α in A549 cells.
Conclusion. The results suggest that NP3 is appropriate to be selected for coating the leather surface due to its properties that are more cyto-friendly as compared to other NPs formulations.

Acknowledgments. The study was funded by UEFISCDI, PNIII_15/2015 under SIINN-ERA-NET Programme.

Downregulation of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in the aorta of APOE-deficient mice using P-selectin targeted RAGE-shRNA lipoplexes

C.A. Constantinescu[1], E.V. Fuior[1], D. Rebleanu[1], G. Voicu[1], M. Deleanu[1], M. Tucureanu[1], E. Butoi[1], I. Mânduţeanu[1], V. Escriou[2], M. Simionescu[1], M. Călin[1]

[1]Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", Bucharest, Romania,

[2]CNRS, Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS) UMR 8258, Paris, France

cristina.constantinescu@icbp.ro

Background. During the vascular inflammation process, endothelial cells (EC) express both RAGE and the cell adhesion molecule, P-selectin that initiate and perpetuate inflammation by promoting leukocyte infiltration into the vascular wall.

Hypothesis. We hypothesize that we could use P-selectin as a target for nanotherapy to efficiently silence RAGE exposed on the vascular activated endothelial cell membrane.

Aim. To target the P-selectin overexpressed in the aorta and to downregulate RAGE expression specifically.

Methodology. P-selectin targeted cationic liposomes (Psel-lipo) were prepared and used to form lipoplexes with different RAGE-shRNA plasmid sequences (Psel-lipo/RAGE-shRNA). The distribution and ability of lipoplexes to transfect the vascular endothelium was assessed by IVIS Imaging System. To down-regulate RAGE expression, Psel-lipo/RAGE-shRNA lipoplexes were i.v. injected 2 times/week for 4 weeks in ApoE-/-mice. After sacrifice, blood and tissue samples were collected and further processed into homogenates. The RAGE expression and the pro-inflammatory cytokines (IL-1β, TNF-α, IL-6, MCP-1) and chemokine (MCP-1) in tissue homogenates were determined by Western-blot and ELISA assay, respectively.

Results. 1) Psel-lipo/RAGE-shRNA lipoplexes bind specifically to the aorta of ApoE-/- mice; 2) Psel-lipo/pEYFP lipoplexes induce the expression of yellow fluorescent protein in the aorta of ApoE-/- mice at 48 hours after administration; 3) the treatment with Psel-lipo/RAGE-shRNA specifically downregulated RAGE in the aorta and liver of ApoE-/- mice; 4) treatment with lipoplexes did not significantly alter the weight of the mice, the liver and kidney function, the plasmatic parameters and the production of inflammatory cytokines.

Conclusion. P-selectin targeted RAGE-shRNA lipoplexes bind specifically to the aorta and downregulate RAGE expression in aorta and liver of ApoE-deficient mice.

Acknowledgments. Study supported by UEFISCDI, PN-II-RU-TE-2014-4-1837 project.

P-selectin targeted lipoplexes carrying a shRNA plasmid to silence receptor for advanced glycation end products decrease monocyte adhesion to activated endothelial cells

G. Voicu[1], C. A. Constantinescu[1,2], D. Rebleanu[1], E.V. Fuior[1], M. Deleanu[1,3], M. Tucureanu[1], E. Butoi[1], I. Mânduţeanu[1], V. Escriou[4,5,6,7], M. Simionescu[1], M. Călin[1]

[1]Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", Bucharest, Romania, [2]UASVM, Faculty of Veterinary Medicine, Bucharest, Romania, [3]UASVM, Faculty of Biotechnologies, Bucharest, Romania, [4]CNRS, Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS) UMR 8258, Paris, France, [5]INSERM, UTCBS U 1022, Paris, France, [6]Université Paris Descartes, Sorbonne-Paris-Cité University, UTCBS, Paris, France, [7]Chimie ParisTech, PSL Research University, UTCBS, Paris, France

geanina.voicu@icbp.ro

Background. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) is expressed on endothelial cells (EC) and plays an essential role in vascular wall inflammation in atherosclerosis.

Hypothesis. P-selectin can be used as a target for nanotherapy of atherosclerosis because it is specifically expressed on the surface of EC in inflammatory processes.

Aim. To develop P-selectin targeted cationic liposomes to function as nanocarriers for specific delivery of shRNA for down-regulation of RAGE in EC.

Methodology. P-selectin targeted cationic liposomes containing the lipid 2-{3-[Bis-(3-amino-propyl)-amino]-propylamino}-N-ditetradecyl carbamoyl methyl-acetamide (DMAPAP) combined with 1,2-Dioleoyl-sn-glycero- 3-phosphoethanolamine (DOPE) were obtained by coupling a peptide with high affinity for P-selectin to a functionalized PEGylated phospholipid inserted in the liposomes' bilayer (Psel-lipo). Then, Psel-lipo were complexed with a mix of five plasmids containing shRNA RAGE sequences at different charge ratios (R). The lipoplexes were characterized for size and zeta potential. The cytotoxicity studies were performed by XTT assay after exposing EC (bEnd.3 cells) to targeted (Psel-lipo/shRAGE) and non-targeted (Scr-lipo/shRAGE) lipoplexes for 48 hours. The efficiency of RAGE down-regulation was analyzed by Western Blotting assay at 48, 72 and 96 hours of incubation. Next, we studied the functional role of silencing the RAGE expression on monocytes adhesion to EC, activated or not with LPS.

Results. The mean diameter of lipoplexes was around 150 nm with a zeta potential of -24mV (R=6). For all charge ratios investigated the reduction of cellular viability was about 20%. The treatment of EC with Psel-lipo/shRAGE determines a significative reduction in protein expression of RAGE at 72 hours after transfection and reduces by 50% the adhesion of monocytes to LPS-activated EC.

Conclusion. P-selectin targeted lipoplexes reduce specifically and efficiently the expression of RAGE in EC and decrease the adhesion of monocytes to activated EC.

Acknowledgements. The work was supported by UEFISCDI: PN-II-RU-TE-2014-4-1837 project.

VCAM-1 targeted naringenin-loaded lipid nanoemulsions reduce monocyte adhesion to activated endothelial cells

E.V. Fuior[1], *G. Voicu*[1], *M. Deleanu*[1,2], *D. Rebleanu*[1], *C. A. Constantinescu*[1,3], *F. Safciuc*[1], *M. Simionescu*[1], *M. Călin*[1]

[1]*Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", Bucharest, Romania*
[2] *UASVM, Faculty of Biotechnologies, Bucharest, Romania*
[3]*UASVM, Faculty of Veterinary Medicine, Bucharest, Romania*
elena.fuior@icbp.ro

Background. Naringenin is a citrus flavonoid with well documented anti-atherosclerotic effects. However, the poor water solubility and reduced bioavailability are two major drawbacks for its therapeutic use.

Hypothesis. The encapsulation of naringenin into targeted lipid nanoemulsions (LN) will overcome its limitations and will enable a specific delivery to endothelial cells (EC).

Aim. To reduce TNF-α induced EC-activation with naringenin-loaded nanoemulsions (NAR-LN) directed to the cell adhesion molecule VCAM-1, expressed on activated endothelial cells (EC).

Methodology. NAR-LN, either non-targeted or targeted to endothelium by coupling on the surface a VCAM-1 recognition peptide, were prepared by the ultrasonication method and further characterized. The cytotoxicity studies were performed by XTT assay after exposing the human endothelial cell (EC) line EA.hy926 to various concentrations of NAR-LN for 24 hours. The uptake of Rhodamine-PE labeled LN by EC was assessed by flow cytometry and fluorescence microscopy. Next, we studied the functional role of EC treatment with NAR-LN on monocyte adhesion to EC, activated or not with TNF-α.

Results. Both non-targeted and VCAM-1- targeted LN were taken up by the EC in a dose-dependent manner. A significant increase was noted in the uptake of endothelium-targeted LN upon exposure to TNF-α, unlike the uptake of non-targeted LN, which was independent of endothelial activation by TNF-α. This differential behavior suggests distinct mechanisms of internalization, with a specific pathway for the targeted LN. No deleterious effect of NAR-LN on cell viability at doses corresponding up to 100 μM naringenin/0.5 mM lipid were detected in our experimental set-up. NAR-LN exerted a two times higher percentage of inhibition of monocyte adhesion to the TNF-α activated endothelium as compared to free naringenin at the same concentration.

Conclusion. Poorly water-soluble naringenin, can be successfully encapsulated in LN and targeted to activate EC. Their functional capacity to reduce monocyte adhesion to activated cells guides to further studies to search for their potential benefits in experimental atherosclerosis and diabetes.

Acknowledgments. The study was supported by UEFISCDI, INTERA project contract no. 13PCCDI/2018.

Adenoviral transduction of hepatocytes to induce Fas ligand expression

M. Dumitrescu, V. Truşcă, A. Gafencu, A. Burlacu, M. Simionescu, N. Askenasy

[1]*Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" of the Romanian Academy, Bucharest, Romania*

Background. Fas ligand (FasL) is a member of TNF family which plays a key role in the immune response modulation. The interaction of FasL with its receptor (Fas/CD95) induces apoptosis in activated lymphocytes. The failure of FasL-Fas system contributes to the development of the autoimmune diseases.

Hypothesis. Ectopic expression of functional FasL would be able to induce apoptosis of the auto reactive lymphocytes, limiting their clonal expansion. This pathway could contributes to the restoration of self-tolerance in autoimmune diseases.

Aim. Our goal was to induce ectopic expression of functional FasL in murine hepatocytes, by adenoviral transduction.

Methodology. FasL adenovirus preparation included the following steps: (1) cloning of a FasL mini-gene (the gene without the second intron) in pAdTrack-CMV; (2) recombination of pAdTrack-FasL with AdEasy-1 in chemically transformed BJ5193 bacteria; (3) selection of recombinant clones by PCR; (4) adenoviral packaging in AD293 by transfection with PacI-digested recombinant plasmid using K2 reagent; (5) viral amplification; (6) viral purification by one-step ultracentrifugation on CsCl gradient; (7) adenoviral titration by flow cytometry. Hepa1-6 murine hepatocytes were transduced with 1-10 MOI and tested for FasL expression by RT-PCR, Western blot and flow cytometry. Apoptosis of A20 lymphoma cells after co-culture with adenoviral-transduced Hepa 1-6 cells was evaluated to test FasL function.

Results. FasL mini-gene was cloned into pAdTrack-CMV adenoviral vector. Sanger sequencing showed that the sequence was correct and contained two gene polymorphisms. The adenovirus was packed, amplified and titrated in AD293 cells. From ~$7x10^7$ cells, 10^8-$5x10^9$ transduction units (TU) were obtained for FasL-adenovirus (as compared with ~10^{10} TU for the control virus). For 1 TU/cell, more than 60% Hepa 1-6 cells were infected, while for 10 TU/cell, 100% of the cells were transduced. The infected cells expressed GFP, the reporter gene. Transduced Hepa 1-6 cells expressed FasL mRNA, as determined by RT-PCR, and FasL protein, as revealed by Western Blot and flow cytometry. FasL expressed by transduced hepatocytes was able to induce apoptosis of A20 lymphoma cells.

Conclusion. The adenovirus bearing FasL mini-gene is able to transduce hepatocytes with a very good yield. FasL expressed by transduced hepatocytes is properly folded and is functional in inducing cell apoptosis.

Acknowledgments. The work was supported by grants from the Ministry of European Funds POC-A.1-A.1.1.4-E-2015 (ID: P_37_668, acronym DIABETER) and the Romanian Academy.

Up-regulated NADPH oxidase-derived reactive oxygen species induce macrophage polarization towards M1 phenotype *in vitro*; potential implication in human atherosclerosis

M.L. Vlad[1], *A.G. Lazar*[1], *S.A. Manea*[1], *M. Raicu*[1], *H. Muresian*[2], *M. Simionescu*[1], *A. Manea*[1]

[1]*Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", Bucharest, Romania*
[2]*Cardiovascular Surgery Department, University Hospital of Bucharest, Bucharest, Romania*

loredana.antonescu@icbp.ro

Background. Oxidative stress microenvironment shapes the phenotype of monocyte (Mon)-derived macrophage (Mac) in atherosclerosis. Two major Mac populations with different major phenotypes have been described: the pro-inflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2).

Hypothesis. Down-regulation of proinflammatory molecules expression in M1-Mac and/or active induction of a specific M2-Mac subset may be therapeutically relevant for the outcome of atherosclerosis. NADPH oxidases (Nox) are major sources of reactive oxygen species (ROS) in Mac contributing to atheroma formation. The role of Nox-derived ROS in Mac polarization via redox-sensitive mechanisms is not known.

Aim. This study aimed at investigating the implication of Nox enzymes in mediating Mac polarization in atherosclerosis.

Methodology. Non-atherosclerotic (superior thyroid artery) and atherosclerotic (carotid artery) samples obtained as discarded tissues from patients undergoing carotid endarterectomy were used. Human THP-1 Mac were polarized into M1 and M2-Mac. The cells were further exposed (24 h) to M1/M2 polarization factors in absence/presence of vehicle or GKT137831, a clinically approved Nox1/4 pharmacological inhibitor.

Results. We found that Nox1, Nox2, Nox4, and Nox5 were significantly up-regulated in human atherosclerotic plaques compared to non-atherosclerotic samples. Immunohistochemical staining of human atherosclerotic lesions revealed that Nox proteins are up-regulated within $CD68^+/CD45^+$ Mac-rich areas. Significant increases in Nox1, Nox2, Nox4, and Nox5 expression levels were detected in M1-Mac as compared to resting Mac (M0) and M2-Mac in vitro. Pharmacological inhibition of Nox greatly reduced the expression markers defining the M1-Mac phenotype (TNFα, MCP-1, TLR2, TLR4, NOS2) and produced a significant up-regulation of CD163, a M2-Mac marker, in both M1-Mac and M2-Mac.

Conclusion. Our data indicate the existence of a new redox-sensitive mechanism whereby ROS generated by activated Nox contribute to Mac polarization. Pharmacological inhibition of Nox may be an attractive therapeutic strategy to reduce the overproduction ROS and inflammatory mediators derived from M1-activated Mac in atherosclerosis.

Acknowledgments. The work was supported by projects no. PN-III-P4-ID-PCE-2016-0665 and PN-III-P1-1.1-TE-2016-0851 financed by UEFISCDI.

INDEX

A
Abramowicz A., 80
Airini R., 102
Albulescu L., 39
Albulescu R., 39, 94
Alexandru D., 102
Alexandru N., 98, 99, 100, 103
Amuzescu B., 102
Anda, P., 29
Antohe F., 21, 46, 62, 96, 107, 109
Antolak A., 93
Antonescu, M.L., 56
Askenasy N., 115

B
Bala C., 51
Bazylak G., 70
Bednarczyk K., 58
Behounek M., 81
Berg S., 109
Berindan-Neagoe I., 84
Bhide K., 29
Bhide M., 29
Bielińska I., 74
Bischoff R., 27
Bodzon-Kulakowska A., 67, 93
Boteanu R.M., 46, 62, 107, 109
Bourdon David, 35
Bucci J., 89
Burlacu A., 115
Buse M., 84
Butoi E., 101, 112, 113

C
Călin M., 44, 111, 112, 113, 114
Calvete J.J., 57
Carnell-Morris P., 43
Carnuta M. G., 104
Carrington S., 52
Cecoltan S., 101
Cervenka L., 81
Chekan M., 58, 79
Chen Y. S., 43
Chiriţoiu G.N., 73
Chmel M., 81
Ciobanu D.M., 51
Ciortan L., 101
Clemmer D.E., 54
Codrici E., 39
Coman C., 109
Constantin A., 96, 98, 99, 103
Constantinescu C.A., 44, 100, 111, 112, 113, 114
Corrales J.F., 49
Costache A., 95
Costache R., 96
Craciun A.E, 51
Croitoru S.M., 62

D
Dauly C., 33
Davalieva K., 59, 88
Dąbrowska A., 76, 82
Deleanu M., 105, 111, 112, 113, 114
Dennison T., 43
Dima S., 94
Dinişchiotu A., 72
Dit Fouque D.J., 42
Dmitrieva E., 78
Doering G., 34
Dom M., 55
Dor M., 35
Dragan E., 104
Drahos László, 42
Droc I., 101
Dubey R.K., 96
Dudek B., 22
Dulceanu M.D., 104
Dumitrescu M., 98, 99, 103, 106, 115
Dundr P., 38
Dvorankova B., 38

E
Enciu A.M., 39
Escriou V., 112, 113

F
Fenyo I.M., 56, 100, 106
Filippi A., 98, 100
Fuior E.V., 44, 104, 112, 113, 114
Furdui C.M., 53

G
Gadher S.J., 35, 61, 89
Gafencu A.V., 106, 115
Gaidau C., 111
Gallien S., 33
Gawin M., 58, 79
Georgescu A., 98, 99, 100, 102, 103
Ghenea S., 73
Gibula-Bruzda E., 93
Gładysińska M., 80
Govorukhina N.I., 27
Grumezescu V., 62
Guja C., 99
Güzel C., 27

H
Hansen R., 46, 100
Havlenova T., 81
Heck A.J., 71
Hermans J., 27
Holada K., 75
Horvatovich P.L., 27
Huhmer A., 33

Hupfer Y., 22

I

Ignat M., 111
Ion L., 30
Ionescu A.E., 71
Iordache F., 102
Iuga C.A, 84
Ivan L., 46, 62, 107, 109
Ivanov O., 60

J

Jakubowski H., 74, 87
Jandus C., 73
Jankovska E., 75
Jarkovska K., 89
Juhas S., 89

K

Keller L., 32
Kennedy M., 36
Kiprijanovska S., 59, 88
Kishazi E., 35
Klont F., 27
Koch H., 40
Koch S., 40
Kodet O., 38
Komina S., 59, 88
Kosowicz K., 82
Kotlinska J.H., 86, 93
Kotrcova E., 89
Kovarova H., 38, 89
Krajsova I., 38
Kucera J., 38
Kurczyk A., 58

L

Lacina L., 38
Lascar I., 108
Lazar A.G., 56, 116
Leney A.C., 71
Letova A., 78
Leu Y.L., 70
Lorenz, S., 22
Lubeck M., 40
Luider T.M., 27, 37

M

Macarie R.D., 101
Macht M., 40
Mânduţeanu I., 100, 101, 112, 113
Manea A., 56, 116
Manea S.A., 116
Maniu H., 102
Marczak Ł, 68, 79, 80, 87
Marinescu G.C., 72
Marszalek-Grabska M., 93
Maulucci Giuseppe, 23
McGann M., 52
Melenovsky V., 81
Memboeuf A., 42
Menezes R. C., 22
Menţel M., 71
Mielczarek P., 67, 76, 77, 83, 86
Mihai M. C., 96
Mihai S., 39
Milewska A., 76, 82
Miller I., 24
Mitulović G, 50
Morar-Bolba G., 84
Motlik J., 89
Mrukwa G., 58
Munteanu C.V.A., 71, 73
Muresian H., 56, 116

N

Neagu A.I., 94
Neagu T.P., 108
Necula L.G., 39, 94
Nemecz M., 98, 99, 103
Ner-Kluza J., 76, 82
Niculescu L.S., 104

O

Onu A., 95
Oppermann M., 33

P

Pacak K., 31
Paetz C., 22
Pan T.L., 70
Panić-Janković T., 45
Passardi F., 61
Perła-Kajan J., 87
Petcu L., 98
Petica A., 111
Petrak J., 31, 75, 81
Petre B.A., 34
Petrescu S.M., 73
Petrusevska G., 88
Picu A., 99
Piechura K., 77
Pietrowska M., 58, 68, 79, 80
Polanska J., 58
Popa M.A., 96
Popescu I., 94
Popescu I.D., 39
Popescu R.G., 72
Pouwels S.D., 27
Pralea I.E., 84
Pruna V., 108
Przybylski M., 34
Pyrć K.A., 76, 82

R

Raether O., 40
Raicu M., 116
Raileanu M., 104, 105
Rebizak B., 67
Rebleanu D., 44, 100, 111, 112, 113, 114
Révész Á., 42
Rogers J., 33
Rokob T.A., 42
Roman G., 51
Romero P., 73
Rosca A.M., 108
Rozmus K., 83
Rusu A., 51
Rutkowski T., 68

S

Safciuc F., 62
Sârbu M., 54, 69
Sasson S., 23

Savu L., 102
Schmit P.O., 40
Schneider B., 22
Sebata T., 35
Semke A., 78
Seregin A., 78
Sikora M., 74, 87
Silberring J., 77, 83, 86
Sima A.V., 104, 105
Sima L., 62
Simionescu A., 101
Simionescu D., 100
Simionescu M., 44, 56, 96, 98, 99, 103, 107, 108, 112, 113, 114, 115, 116
Simionescu N., 104
Skalnikova K.H., 38
Skowronek A., 68
Smetana Jr. K., 38
Smeu B., 98, 99
Smirnova L., 78
Smolarz M., 80
Smoluch M., 86
Socol G., 62
Stancu C. S., 104, 105
Stankov O., 59, 88
Stavridis S., 59, 88
Stork J., 38
Strnadova K., 38
Suder P., 76, 82, 93
Supljika F., 52
Svatoš A., 22
Svitek M., 75
Szabo P., 38
Szedlacsek Ș.E., 71

Ș

Șuică V.I., 46, 62, 96, 107, 109

T

Tănase C., 39, 94
Tanko G., 98, 99, 103
ten Hacken N.H.T., 27
Titorencu I., 108
Tofan V., 95
Toma L., 105
Truşcă V.G., 106, 115
Țucureanu C., 95
Țucureanu M.M, 101, 112, 113
Tudorache I.F., 106
Turck N., 35
Turiák L., 42

Ț

Țuțuianu R., 108

U

Ulrich M., 34
Uyy E., 46, 62, 107, 109

V

Vadana M., 101
Valekova I., 89
van de Merbel N.C., 27
van der Zee A.G.J., 27
Van Ostade X., 55
Van den Berghe W., 55
Vékey K., 42
Vernet R., 61
Viner R., 33
Vit O., 31
Vlad M.L., 116
Vlagioiu C., 62
Vodicka P., 38
Vogel H., 22
Voicu G., 44, 100, 111, 112, 113, 114
Von Rohr O., 61
Vukelić Ž., 54, 69

W

Wang P.W., 70
Warskulat A.C., 22
Widlak P., 58, 68, 79
Wielsch N., 22
Wojakowska A., 79
Wolters J.C., 27
Wu T.H., 70
Wu Y.C., 70

Z

Zamfir A.D., 54, 69
Zgoda V., 78
Zimța A., 84
Zingale G.A., 77

The 12th Central and Eastern European Proteomic Conference
jointly with
the 39th Anniversary of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"

October 24-26, 2018, Bucharest, Romania

BOOK OF ABSTRACTS

Edited by

©

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", Bucharest, 2018
All rights reserved

ISBN 978-606-023-012-0

ACADEMIA ROMÂNĂ
Vicepreşedinte

ACADEMIA ROMÂNĂ
REGISTRATURA GENERALĂ
Nr. 3352 din 14.09.2021

Către *Departamentele SCOSAAR ale Academiei Române*
În atenţia Doamnelor / Domnilor / Directori de Departament

În conformitate cu prevederile legale privind organizarea doctoratului în cadrul Academiei Române şi în temeiul *Regulamentului SCOSAAR*, aprobat în Prezidiul Academiei Române, disponibil pe site-ul acesteia, vă facem următoarele precizări privind organizarea şi desfăşurarea admiterii la doctorat în anul universitar 2021-2022.

1. Colocviul de admitere la doctorat se organizează numai în institutele de cercetare abilitate (I.C.A.) să organizeze doctorate în sistemul academic şi numai pentru conducătorii de doctorat care au optat să conducă doctorate numai în sistemul de cercetare academic şi cărora li s-au aprobat locuri de admitere, prin hotărârea Prezidiului Academiei Române din 07.09.2021.

2. Bibliografia aferentă colocviului va fi disponibilă candidaţilor pe site-ul I.C.A. şi SCOSAAR.

3. Înscrierile la colocviul de admitere se vor face în perioada 15 septembrie - 22 septembrie 2021 la I.C.A.

4. Colocviul de admitere la doctorat se va desfăşura în perioada 24 - 30 septembrie 2021 în conformitate cu prevederile *Regulamentului SCOSAAR* aprobat în şedinţa Prezidiului Academiei Române. Rezultatele vor fi afişate pe data de 01 octombrie 2021, iar rezultatele finale pe 06 octombrie 2021.

5. Având în vedere faptul că prelucrarea datelor cu caracter personal este supusă respectării principiilor prevăzute de art. 5 din Regulamentul (UE) 2016/679 privind protecţia persoanelor fizice în ceea ce priveşte prelucrarea datelor cu caracter personal şi privind libera circulaţie a acestor date şi de abrogarea Directivei 95/46/CE (Regulamentul general privind protecţia datelor) – RGPD, vă recomandăm să luaţi în considerare analiza posibilităţii ca afişarea rezultatelor concursurilor de admitere organizate de către instituţia dumneavoastră să se efectueaze cu anonimizarea numelui şi prenumelui candidatului. În ipoteza în care veţi lua această măsură, urmează ca persoanele vizate (candidaţii) să fie informate despre aceasta.

6. Rezultatele concursului de admitere la doctorat împreună cu situaţia la zi a doctoranzilor în evidenţă se vor transmite la Compartimentul SCOSAAR de către fiecare I.C.A., în termen de trei zile de la data afişării rezultatelor.

7. Compartimentul SCOSAAR va supune aprobării Consiliului Ştiinţific SCOSAAR şi Prezidiului Academiei Române listele cu noii doctoranzi admişi prin concurs şi în temeiul aprobării obţinute, aceştia vor fi înmatriculaţi la data de 01 noiembrie 2021.

Acad. Bogdan C. Simionescu

Vicepreşedinte al Academiei Române

ACADEMIA ROMÂNĂ
Vicepreşedinte

ACADEMIA ROMÂNĂ
REGISTRATURA GENERALĂ
Nr. 2275 din 31.05.2023.

Către Şcolile Doctorale din cadrul Academiei Române - SCOSAAR
În atenţia Doamnelor / Domnilor / Directori

În conformitate cu prevederile legale privind organizarea doctoratului în cadrul Academiei Române şi în temeiul *Regulamentului SCOSAAR*, aprobat în Prezidiul Academiei Române, disponibil pe site-ul acesteia, vă facem următoarele precizări privind organizarea şi desfăşurarea admiterii la doctorat în anul universitar 2023-2024.

1. Colocviul de admitere la doctorat se organizează numai în institutele de cercetare abilitate (I.C.A.) să organizeze doctorate în sistemul academic şi numai pentru conducătorii de doctorat care au optat să conducă doctorate numai în sistemul de cercetare academic şi cărora li s-au aprobat locuri de admitere, prin hotărârea Prezidiului Academiei Române.

2. Bibliografia aferentă colocviului va fi disponibilă candidaţilor pe site-ul I.C.A. şi SCOSAAR.

3. Înscrierile la colocviul de admitere se vor face în perioada 18 septembrie - 29 septembrie 2023 la I.C.A.

4. Colocviul de admitere la doctorat se va desfăşura în perioada 02 - 06 octombrie 2023 în conformitate cu prevederile *Regulamentului SCOSAAR* aprobat în şedinţa Prezidiului Academiei Române. Rezultatele vor fi afişate pe data de 09 octombrie 2023.

5. Având în vedere faptul că prelucrarea datelor cu caracter personal este supusă respectării principiilor prevăzute de art. 5 din Regulamentul (UE) 2016/679 privind protecţia persoanelor fizice în ceea ce priveşte prelucrarea datelor cu caracter personal şi privind libera circulaţie a acestor date şi de abrogarea Directivei 95/46/CE (Regulamentul general privind protecţia datelor) – RGPD, vă recomandăm să luaţi în considerare analiza posibilităţii ca afişarea rezultatelor concursurilor de admitere organizate de către instituţia dumneavoastră să se efectueaze cu anonimizarea numelui şi prenumelui candidatului. În ipoteza în care veţi lua această măsură, urmează ca persoanele vizate (candidaţii) să fie informate despre aceasta.

6. Rezultatele concursului de admitere la doctorat împreună cu situaţia la zi a doctoranzilor în evidenţă se vor transmite Şcolii de Studii Avansate a Academiei Române, de către fiecare I.C.A., în termen de trei zile de la data afişării rezultatelor.

7. Şcoala de Studii Avansate a Academiei Române va supune aprobării CSUD şi Prezidiului Academiei Române listele cu noii doctoranzi admişi prin concurs şi în temeiul aprobării obţinute, aceştia vor fi înmatriculaţi la data de 1 noiembrie 2023.

VICEPREŞEDINTE

Acad. Marius Andruh

Academia Română, Calea Victoriei 125, cod 010071, Sector 1, Bucureşti
Tel/ Fax: (+4021) 2128658 e-mail:marius.andruh@acad.ro

ACADEMIA ROMÂNĂ
Vicepreşedinte

ACADEMIA ROMÂNĂ
REGISTRATURA GENERALĂ
Nr. 3502 din 09.02.2022

Către *Departamentele SCOSAAR ale Academiei Române*
În atenţia Doamnelor / Domnilor / Directori de Departament

În conformitate cu prevederile legale privind organizarea doctoratului în cadrul Academiei Române şi în temeiul *Regulamentului SCOSAAR*, aprobat în Prezidiul Academiei Române, disponibil pe site-ul acesteia, vă facem următoarele precizări privind organizarea şi desfăşurarea admiterii la doctorat în anul universitar 2022-2023.

1. Colocviul de admitere la doctorat se organizează numai în institutele de cercetare abilitate (I.C.A.) să organizeze doctorate în sistemul academic şi numai pentru conducătorii de doctorat care au optat să conducă doctorate numai în sistemul de cercetare academic şi cărora li s-au aprobat locuri de admitere, prin hotărârea Prezidiului Academiei Române din 06.09.2022.

2. Bibliografia aferentă colocviului va fi disponibilă candidaţilor pe site-ul I.C.A. şi SCOSAAR.

3. Înscrierile la colocviul de admitere se vor face în perioada 26 septembrie - 05 octombrie 2022 la I.C.A.

4. Colocviul de admitere la doctorat se va desfăşura în perioada 10 - 14 octombrie 2022 în conformitate cu prevederile *Regulamentului SCOSAAR* aprobat în şedinţa Prezidiului Academiei Române. Rezultatele vor fi afişate pe data de 19 octombrie 2022.

5. Având în vedere faptul că prelucrarea datelor cu caracter personal este supusă respectării principiilor prevăzute de art. 5 din Regulamentul (UE) 2016/679 privind protecţia persoanelor fizice în ceea ce priveşte prelucrarea datelor cu caracter personal şi privind libera circulaţie a acestor date şi de abrogarea Directivei 95/46/CE (Regulamentul general privind protecţia datelor) – RGPD, vă recomandăm să luaţi în considerare analiza posibilităţii ca afişarea rezultatelor concursurilor de admitere organizate de către instituţia dumneavoastră să se efectueaze cu anonimizarea numelui şi prenumelui candidatului. În ipoteza în care veţi lua această măsură, urmează ca persoanele vizate (candidaţii) să fie informate despre aceasta.

6. Rezultatele concursului de admitere la doctorat împreună cu situaţia la zi a doctoranzilor în evidenţă se vor transmite Şcolii de Studii Avansate a Academiei Române, de către fiecare I.C.A., în termen de trei zile de la data afişării rezultatelor.

7. Şcoala de Studii Avansate a Academiei Române va supune aprobării Consiliului Ştiinţific SCOSAAR şi Prezidiului Academiei Române listele cu noii doctoranzi admişi prin concurs şi în temeiul aprobării obţinute, aceştia vor fi înmatriculaţi la data de 01 noiembrie 2022.

VICEPREŞEDINTE,

Acad. Marius Andruh

Academia Română, Calea Victoriei 125, cod 010071, Sector 1, Bucureşti
Tel/ Fax: (+4021) 2128658 e-mail:marius.andruh@acad.ro

Regulation of HDL Genes: Transcriptional, Posttranscriptional, and Posttranslational

Dimitris Kardassis, Anca Gafencu, Vassilis I. Zannis, and Alberto Davalos

Contents

1 Regulation of Genes Involved in HDL Metabolism at the Transcriptional Level 117
1.1 General Introduction to Hormone Nuclear Receptors 118
1.2 Transcriptional Regulation of the apoA-I Gene in the Liver 119
1.2.1 The Role of the Distal Enhancer in apoA-I Gene Transcription 123
1.2.2 Other Factors Regulating apoA-I Gene Transcription 124
1.3 Transcriptional Regulation of the ABCA1 Gene 125
1.3.1 Upregulatory Mechanisms of ABCA1 Gene Expression 125
1.3.2 Negative Regulation of ABCA1 Gene Transcription 129
1.4 Transcriptional Regulation of the ABCG1 Gene 130
1.5 Transcriptional Regulation of the Apolipoprotein E Gene 132
1.5.1 Proximal Regulatory Binding Sites Involved in the apoE Gene Expression 134
1.5.2 Distal Regulatory Binding Sites That Modulate apoE Gene Expression in Macrophages 135
1.6 Transcriptional Regulation of the Human apoM Gene in the Liver 136
1.7 Transcriptional Regulation of the CETP Gene 138
1.8 Transcriptional Regulation of the PLTP Gene 139
1.9 Transcriptional Regulation of the Bile Acid Transporters ABCG5/ABCG8 140
1.10 Transcriptional Regulation of the HDL Receptor SR-BI 141

D. Kardassis (✉)
Department of Biochemistry, University of Crete Medical School and Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation of Research and Technology of Hellas, Heraklion, Crete 71110, Greece
e-mail: kardasis@imbb.forth.gr

A. Gafencu
Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", Bucharest, Romania

V.I. Zannis
Section of Molecular Genetics, Boston University Medical Center, Boston, MA 02118, USA

A. Davalos
Laboratory of Disorders of Lipid Metabolism and Molecular Nutrition, Madrid Institute for Advanced Studies (IMDEA)-Food, Ctra. de Cantoblanco 8, 28049 Madrid, Spain

© The Author(s) 2015

A. von Eckardstein, D. Kardassis (eds.), *High Density Lipoproteins*, Handbook of Experimental Pharmacology 224, DOI 10.1007/978-3-319-09665-0_3

2 Posttranscriptional Regulation of HDL Genes by Noncoding RNAs and microRNAs . . 143
2.1 miRNAs: Biogenesis and Function 144
2.2 Posttranscriptional Modulation of HDL Metabolism by miRNAs 146
2.2.1 Targeting ABCA1 and ABCG1 146
2.2.2 Targeting SR-BI 149
2.2.3 Targeting Other miRNAs Related to HDL Biogenesis and Function 150
3 Posttranslational Mechanisms of HDL Regulation 150
3.1 ABCA1 150
3.2 ABCG1 154
3.3 SR-BI 155
References 157

Abstract

HDL regulation is exerted at multiple levels including regulation at the level of transcription initiation by transcription factors and signal transduction cascades; regulation at the posttranscriptional level by microRNAs and other noncoding RNAs which bind to the coding or noncoding regions of HDL genes regulating mRNA stability and translation; as well as regulation at the posttranslational level by protein modifications, intracellular trafficking, and degradation. The above mechanisms have drastic effects on several HDL-mediated processes including HDL biogenesis, remodeling, cholesterol efflux and uptake, as well as atheroprotective functions on the cells of the arterial wall. The emphasis is on mechanisms that operate in physiologically relevant tissues such as the liver (which accounts for 80 % of the total HDL-C levels in the plasma), the macrophages, the adrenals, and the endothelium. Transcription factors that have a significant impact on HDL regulation such as hormone nuclear receptors and hepatocyte nuclear factors are extensively discussed both in terms of gene promoter recognition and regulation but also in terms of their impact on plasma HDL levels as was revealed by knockout studies. Understanding the different modes of regulation of this complex lipoprotein may provide useful insights for the development of novel HDL-raising therapies that could be used to fight against atherosclerosis which is the underlying cause of coronary heart disease.

Keywords

High-density lipoprotein • Regulation • Transcriptional • Posttranscriptional • Posttranslational • miRNAs • Protein stability • Hormone nuclear receptors • Hepatocyte nuclear factors • apoA-I • ABCA1 • ABCG1 • ABCG5 • ABCG8 • apoE • SR-BI • CETP

List of Abbreviations

HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
12/15LO	12/15-Lipoxygenase
AP1	Activator protein 1
AF1	Activation function 1
Ang	Angiotensin
apoA-I	Apolipoprotein A-I
apoB	Apolipoprotein B
apoE	Apolipoprotein E
apoM	Apolipoprotein M
ARP-1	Apolipoprotein A-I-regulated protein 1
DHHC8	Asp-His-His-Cys 8
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ABCG1	ATP-binding cassette transporter G1
BIG1	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
CAV-1	Caveolin 1
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
COUP-TFI	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I
CEH	Cholesterol ester hydrolase
CETP	Cholesterol ester transfer protein
3C	Chromosome conformational capture
CLA	Conjugated linoleic acid
CAR	Constitutive androstane receptor
CREB	Cyclic AMP response element-binding protein
DNase	Deoxyribonuclease
DR4	Direct repeat with 4 nucleotides in the spacer region
DBD	DNA-binding domain
EGR-1	Early growth response protein 1
LIPG	Endothelial lipase
EE	Early endosome
ER	Endoplasmic reticulum
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
ERα and β	Estrogen receptors α and β
ERE	Estrogen response element
ESRRG	Estrogen receptor-related gamma
FXR	Farnesoid X receptor
FXRE	Farnesoid X receptor-responsive element
FF	Fenofibrate
FOXA2	Forkhead box A2
FOXO1	Forkhead box O1
GF	Gemfibrozil

GR	Glucocorticoid receptor
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3β
HNF-4	Hepatocyte nuclear factor-4
HDL	High-density lipoprotein
HDL-C	High-density lipoprotein cholesterol
Hcy	Homocysteine
HRE	Hormone response element
IRAK-1	IL-1 receptor-associated kinase 1
IDOL	Inducible degrader of the LDLR
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KO	Knockout
KLF4	Kruppel-like factor 4
LCAT	Lecithin-cholesterol acyltransferase
LXR	Liver X receptor
LXRE	Liver X receptor response element
LRH-1	Liver receptor homologue-1
LBD	Ligand-binding domain
LPS	Lipopolysaccharide
LDLR	Low-density lipoprotein receptor
LAL	Lysosomal acid lipase
MCSF	Macrophage colony-stimulating factor
miRNAs	microRNAs
MEKK	Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
ME	Multienhancer
MVB	Multivesicular bodies
DMHCA	N,N-Dimethyl-3β-hydroxycholenamide
NHERF	Na^+/H^+ exchanger regulator factor
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NFY	Nuclear factor Y
ORP1S	Oxysterol-binding protein-related protein 1S
PDZK1	PDZ domain-containing adaptor protein
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptors
PPRE	Peroxisome proliferator-activated receptor-responsive element
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PI3K	phosphatidylinositol 3- kinase
PLD	Phospholipase D
PGC-1	PPARgamma coactivator 1
PLTP	Phospholipid transfer protein
pri-miRNA	Primary long miRNA
PREB	Prolactin regulatory element-binding
PEST	Proline, glutamic acid, serine, threonine
PKC	Protein kinase C
PCA	Protocatechuic acid

PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
RAR	Retinoic acid receptor
RORα	Retinoic acid receptor-related orphan receptor α
RXRα	Retinoid X receptor α
RISC	RNA-induced silencing complex
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
SPTLC1	Serine palmitoyltransferase 1
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SHP	Small heterodimer partner
siRNAs	Small interfering RNAs
SP1	Specificity protein 1
S1P	Sphingosine 1 phosphate
SRC-1	Steroid receptor coactivator-1
SF-1	Steroidogenic factor-1
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
SREs	Sterol-responsive elements
TRβ	Thyroid hormone receptor β
TAD	Transactivation domain
TGFβ1	Transforming growth factor β1
TNFα	Tumor necrosis factor α
Tpl2	Tumor progression locus 2
UTR	Untranslated region
URE	Upstream regulatory element
USF	Upstream stimulatory factors
VDR	Vitamin D receptor
WT	Wild type
YY1	Yin Yang 1
ZIC	Zinc finger of the cerebellum
ZNF202	Zinc finger protein 202

1 Regulation of Genes Involved in HDL Metabolism at the Transcriptional Level

A large body of work generated over the past four decades has revealed that eukaryotic gene transcription is a remarkably intricate biochemical process that is tightly regulated at many levels by the ordered assembly of multiprotein transcription initiation complexes to specific regulatory regions in the promoters of genes (Roeder 1998, 2005; Lemon and Tjian 2000). Despite the progress made, still limited knowledge regarding the details exists. It is believed that specificity in gene regulation is determined by the unique order of *cis*-acting regulatory regions which are recognized by sequence-specific DNA-binding transcription factors. Recent advances in gene regulation technologies including the powerful chromatin

immunoprecipitation assay have enabled the monitoring in real time of the ordered assembly and the disassembly of transcription factor complexes on the promoters and the enhancers of genes in response to extracellular or intracellular cues (Christova 2013; Rodriguez-Ubreva and Ballestar 2014). High-throughput sequencing technologies have revolutionized the fields of genomics, epigenomics, and transcriptomics and have provided novel insights into the transcription signatures of human diseases (Churko et al. 2013). Furthermore, using new powerful methodologies such as chromosome conformation capture (3C) and its derivatives, we are at a position to monitor dynamic intra- and interchromosomal interactions that allow the optimal expression of genes at a given time and space (Gavrilov et al. 2009; Wei et al. 2013).

Transcription factors may be constitutively active in a cell or work in an inducible mode in response to various ligands and signal transduction pathways. The cross talk between different signaling pathways which orchestrate the cellular responses can be facilitated by the physical and functional interactions between transcription factors, and these interactions can be monitored by various methods both in vivo and in vitro. All known transcription factors are modular in nature and contain a DNA-binding domain and a transcriptional activation domain (Mitchell and Tjian 1989; Lemon and Tjian 2000). In addition, several factors contain a dimerization domain that permits them to form homodimers and/or heterodimers. A variety of nuclear receptors for steroids, thyroids, retinoids, etc. contain a ligand binding site. Via their transcription activation domains, transcription factors appear to facilitate the recruitment of the proteins of the coactivator complex and the basal transcription complex to the transcription initiation site of each gene and thus initiate transcription (Roeder 2005). Importantly, the activity of transcription factors can be modulated by drugs against diseases such as cancer and cardiovascular disease as exemplified by the drugs that activate or repress the hormone nuclear receptors (Gronemeyer et al. 2004).

It is beyond the scope of this chapter to provide a thorough review of the different mechanisms of transcriptional regulation of eukaryotic genes or to describe extensively the different classes of transcription factors, their structures, and their mode of regulation. We will only focus on those classes of transcription factors that have been shown to play key roles in the regulation of the genes involved in lipid and lipoprotein metabolism and more specifically on those involved in the metabolism of high-density lipoproteins (HDL) such as the hormone nuclear receptors.

1.1 General Introduction to Hormone Nuclear Receptors

Hormone nuclear receptors belong to a superfamily of transcription factors that are activated by steroid hormones (estrogens, androgens, glucocorticoids, etc.), retinoids, thyroids, and products of intermediate metabolism such as bile acids, fatty acids, and cholesterol derivatives, among others (Gronemeyer et al. 2004). Some members of this family do not need ligand binding to regulate transcription

and are classified as "orphans" (Blumberg and Evans 1998). Nuclear receptors are structurally highly conserved. In terms of primary structure, the highest degree of homology among family members is in the DNA-binding domain that contains two zinc fingers (Helsen et al. 2012). Nuclear receptors also contain two transactivation domains (TADs), one N-terminal ligand-independent TAD called activation function 1 (AF1) and a ligand-dependent TAD called AF2 located close to the ligand-binding domain (LBD) (Rochel et al. 2011). Nuclear receptors bind to hormone response elements (HREs) on the promoters of target genes either as homodimers or as heterodimers with the retinoid X receptor (RXR). The HREs consist of direct repeats (DRs), inverted repeats (IRs), or palindromic repeats (PRs) of the consensus sequence 5′ AG(G/T)TCA 3′. The repeats are separated by 1, 2, 3, 4, or 5 nucleotides and are designated DR1, DR2, etc. (for the direct repeats); IR1, IR2, etc. (for the inverted repeats); and PR1, PR2, etc. (for the palindromic repeats) as described previously (Kardassis et al. 2007; Helsen et al. 2012). The HRE type and inter-repeat spacing determine to a large degree the specificity in nuclear receptor binding, but this rule is not strict at all. For instance, both LXR/RXR and T3R/RXR heterodimers prefer to bind to DR4 HREs, whereas RAR/RXR heterodimers bind to DR5. The direct repeats with one base spacing (DR1 type) appear to be very promiscuous as they bind RXR, COUP-TFI, ARP-1, and HNF-4 homodimers and PPAR/RXR, RAR/RXR, COUP-TFI/RXR, and ARP-1/RXR heterodimers (Nakshatri and Bhat-Nakshatri 1998). The elucidation of the three-dimensional structure of the ligand-binding domain of several nuclear receptors by X-ray crystallography in the absence and in the presence of ligands has allowed a good understanding of the modulation of nuclear receptor action by ligands and the development of very potent agonists and antagonists, some of which have been used therapeutically (Bourguet et al. 2000). Chromatin immunoprecipitation studies usually reveal that nuclear receptors are constitutively nuclear and bound to chromatin but they are transcriptionally silent in the absence of ligand. The binding of the ligand to the LBD causes a major conformational change to this domain which culminates in the recruitment of nuclear receptor coactivators such as PGC-1 and CBP/p300 and the displacement of corepressors (Chen and Li 1998; Liu and Lin 2011). Nuclear receptors can cross talk with other transcription factors in a positive or a negative manner as exemplified by the negative regulation of Jun or NF-κB transcription factors by the glucocorticoid receptors during inflammation, a mechanism termed *trans*-repression (Adcock and Caramori 2001).

1.2 Transcriptional Regulation of the apoA-I Gene in the Liver

The hypothesis that apolipoprotein (apo) A-I overexpression positively influences plasma concentrations of HDL cholesterol (HDL-C) has been validated experimentally in transgenic mice expressing human apoA-I under homologous or heterologous regulatory sequences. These mice have significantly elevated plasma levels of HDL-C and human apoA-I (Rubin et al. 1991; Kan et al. 2000). These "humanized" apoA-I transgenic mice are valuable tools for the study of apoA-I gene regulation

in vivo. Furthermore, it was demonstrated that the overexpression of apoA-I in apoE KO or LDLR KO mice via transgene- or adenovirus-mediated gene transfer reduced atherosclerosis development confirming the anti-atherogenic role of apoA-I upregulation (Paszty et al. 1994; Belalcazar et al. 2003; Valenta et al. 2006).

In humans, the apoA-I gene is expressed abundantly in the liver and intestine and to a lesser extent in other tissues (Zannis et al. 1985). Early studies had established that the human apoA-I promoter containing 250 bp upstream from the transcription start site of the gene is sufficient to drive liver-specific gene expression both in cell cultures and in mice (Walsh et al. 1989; Tzameli and Zannis 1996; Hu et al. 2010a). This promoter region is rich in nuclear factor binding sites and responds to various intracellular as well as extracellular ligands (Zannis et al. 2001a; Haas and Mooradian 2010). As shown in Fig. 1, prominent role in the regulation of the apoA-I promoter play two hormone response elements (HREs) located at positions −210/−190 and −132/−120 that bind members of the hormone nuclear receptor superfamily in a competitive manner (Tzameli and Zannis 1996).

One of the nuclear receptors that plays a prominent role in apoA-I gene regulation in the liver and the intestine is the hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4).

HNF-4 was discovered as a rat liver nuclear protein that binds to the promoters of liver-specific genes such as transthyretin and apolipoprotein C-III (Sladek 1994). In the adult organism, HNF-4 is expressed in the liver, kidney, intestine, and pancreas (Sladek 1994). The total disruption of the HNF-4 gene in mice leads to an embryonic lethal phenotype due to the impairment of endodermal differentiation and gastrulation (Chen et al. 1994). This early developmental arrest was rescued by the complementation of the HNF-4$\alpha^{-/-}$ embryos with a tetraploid embryo-derived

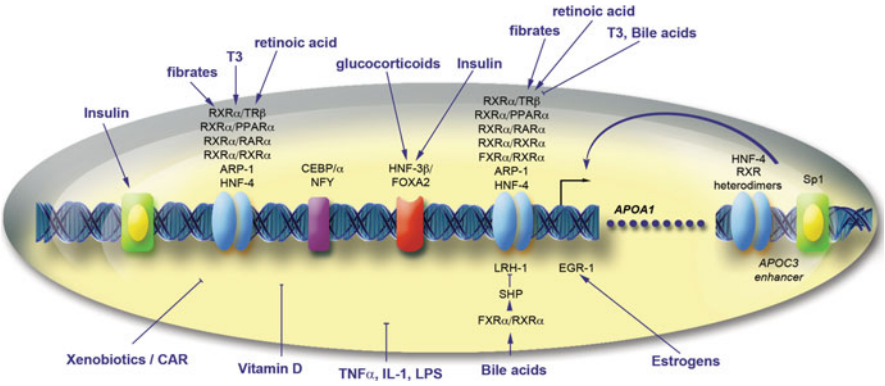


Fig. 1 Regulatory elements and transcription factors that control the expression of the apoA-I gene. *Arrows* and *block lines* denote activation and repression, respectively. The mechanisms are described in detail in the text. Abbreviations: retinoic acid receptor (RAR); retinoid X receptor (RXR); thyroid receptor β (TRβ); farnesoid X receptor (FXR); hepatocyte nuclear factor (HNF); apoA-I regulatory protein 1 (ARP-1); forkhead box 2 (FOXA2); nuclear factor Y (NFY); CCAAT/enhancer-binding protein (CEBP); liver receptor homologue-1 (LRH-1); small heterodimer partner (SHP); specificity protein 1 (Sp1); tumor necrosis factor α (TNFα), interleukin-1 (IL-1); lipopolysaccharide (LPS)

wild-type visceral endoderm (Li et al. 2000). The analysis of the rescued mice showed that the expression of the apoA-I gene as well as of other apolipoprotein genes, shown previously to be regulated by HNF-4 including apoA-II, apoB, apoC-III, and apoC-II, was abolished confirming the cell culture data (Li et al. 2000). Experiments in mice in which the HNF-4 gene was disrupted in the adult liver using Alb-Cre revealed that HNF-4 is essential not only for the establishment but also for the maintenance of hepatic differentiation status (Hayhurst et al. 2001). Lipid and lipoprotein analysis of plasma of these mice revealed a dramatic reduction in total cholesterol, HDL cholesterol, and triglycerides as well as a dramatic increase in the concentration of bile acids (Hayhurst et al. 2001). Furthermore, FPLC analysis showed that HDL cholesterol from the HNF-4 Liv KO mice eluted later than that from controls indicative of the presence of smaller HDL populations. Interestingly, the expression of the two essential genes for HDL biogenesis, namely apoA-I and ABCA1, was not affected in the livers of the HNF-4 Liv KO, suggesting that the reduction in the plasma HDL levels was the result of altered HDL remodeling rather than reduced biosynthesis. In agreement with this, the expression level of the HDL receptor SR-BI gene was dramatically increased (Hayhurst et al. 2001).

Studies in transgenic mice expressing the human apoA-I gene under its own regulatory sequences and clinical studies in humans have shown that fibrates have a positive effect on apoA-I gene transcription as well as on plasma HDL levels. The increase in human apoA-I gene transcription by fibrates is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα) which binds to a PPRE on the proximal apoA-I promoter as a heterodimer with RXRα (Tzameli and Zannis 1996; Staels and Auwerx 1998). This was confirmed by in vivo experiments performed in mice that express human apoA-I under the control of its own promoter but lack the expression of PPARα. When these mice were given fenofibrate (FF) or gemfibrozil (GF) for 17 days, an increase in plasma HDL-C levels was observed by FF and to a lesser extent by GF only in the mice that express endogenous PPARα (Duez et al. 2005). The fibrate-treated mice had larger HDL particles possibly due to the upregulation of phospholipid transfer protein and downregulation of SR-BI (Duez et al. 2005). Interestingly, the apoA-I gene cannot be upregulated by fibrates in rodents due to a three base pair difference in the PPRE rendering the rodent apoA-I PPRE nonfunctional (Vu-Dac et al. 1994). In line with the above findings, liver-specific inactivation of the PPARα heterodimer partner retinoid X receptor α (RXRα) gene in mice was associated with increased expression of the apoA-I gene (Wan et al. 2000).

In a clinical study involving 234 patients with combined hyperlipidemia, both FF and GF reduced triglycerides and increased HDL-C to a similar extent, but only FF treatment increased apoA-I plasma levels, and this was in agreement with the previous clinical trials (Schaefer et al. 1996; Durrington et al. 1998; Sakai et al. 2001; Duez et al. 2005).

A humanized apoA-I transgenic mouse model expressing human apoA-I under its own regulatory sequences in a mouse apoA-I null background was recently used to identify by global gene expression profiling candidate genes that affect lipid and lipoprotein metabolism in response to fenofibrate treatment (Sanoudou et al. 2009).

Bioinformatical analysis and stringent selection criteria (twofold change, 0 % false discovery rate) identified 267 significantly changed genes. In contrast to the study by Duez et al. discussed above (Duez et al. 2005), fenofibrates (FF) did not significantly alter the levels of hepatic human apoA-I mRNA and plasma apoA-I protein. This could be due to differences either in the mouse models used (for instance, the humanized apoA-I mouse of Sanoudou et al. has 2.1 kb apoA-I promoter fragment, whereas the model of Duez et al. has a 5.5 kb apoA-I promoter) or the doses of fibrates (0.2 % w/w in the paper of Duez et al. and 0.03 % in the paper by Sanoudou et al.). Despite the lack of apoA-I responsiveness, the FF treatment increased cholesterol levels 1.95-fold mainly due to the increase in HDL-C. The observed changes in HDL were associated with the upregulation of genes involved in phospholipid biosynthesis and lipid hydrolysis, as well as in the phospholipid transfer protein. The gene encoding the estrogen receptor-related gamma (ESRRG) transcription factor was upregulated 2.36-fold by FF and had a significant positive correlation with genes of lipid and lipoprotein metabolism and mitochondrial functions, indicating an important role of this orphan receptor in mediating the FF-induced activation of a specific subset of its target genes (Sanoudou et al. 2009).

In addition to HNF-4 and PPARα, the two HREs of the proximal human apoA-I promoter bind apoA-I regulatory protein 1 (ARP-1) and liver receptor homologue-1 (LRH-1) which repress and activate the apoA-I promoter, respectively, as illustrated in Fig. 1 (Ladias and Karathanasis 1991; Delerive et al. 2004). LRH-1 is a member of the *fushi tarazu* subfamily of nuclear receptors that is highly expressed in the liver, intestine, pancreas, and ovary (Fayard et al. 2004). In the liver, LRH-1 plays a key role in cholesterol homeostasis, through the control of the expression of genes that are implicated in bile acid biosynthesis and enterohepatic circulation such as CYP7A1, CYP8B1, and ABCG5/8 (del Castillo-Olivares and Gil 2000; Freeman et al. 2004; Kir et al. 2012; Back et al. 2013), reverse cholesterol transport (SR-BI, apoA-I) (Schoonjans et al. 2002; Delerive et al. 2004), and HDL remodeling (CETP) (Luo et al. 2001). However, mice with targeted inactivation of the LRH-1 gene in the liver are characterized by physiological levels of HDL cholesterol, LDL cholesterol, and triglycerides but have a profound effect on bile acid composition in the liver which leads to reduced intestinal reuptake of bile acids and to the enhanced removal of lipids from the body (Mataki et al. 2007). Recent data suggest that LRH-1 functions in a compensatory safeguard mechanism for adequate induction of bile salt synthesis under conditions of high bile salt loss (Out et al. 2011).

The two HREs of the apoA-I promoter also mediate the response of apoA-I to thyroids, retinoids, and bile acids via heterodimers of RXRα with thyroid hormone receptor β (TRβ), retinoic acid receptor α (RARα), and farnesoid X receptor α (FXRα), respectively (Rottman et al. 1991; Hargrove et al. 1999). Although retinoids activate apoA-I gene expression, thyroids have dual effects on apoA-I promoter activity, whereas bile acids inhibit apoA-I gene expression (Taylor et al. 1996; Tzameli and Zannis 1996; Srivastava et al. 2000; Claudel et al. 2002). As shown in Fig. 1, in response to bile acids, FXR downregulates apoA-I gene transcription by two complementary mechanisms: (a) a direct binding

to the apoA-I HRE and (b) an indirect mechanism via the induction of small heterodimer partner (Bavner et al. 2005) which, in turn, represses the activity of LRH-1 (Delerive et al. 2004).

The nuclear receptor constitutive androstane receptor (CAR) regulates the detoxification of xenobiotics and endogenous molecules. In mice, the specific CAR agonist 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP) decreased HDL cholesterol and plasma apoA-I levels in a CAR-specific manner (Masson et al. 2008). In transient transfections, CAR decreased the activity of the human apoA-I promoter in the presence of TCPOBOP, but the mechanism by which this repression is facilitated remains unknown (Masson et al. 2008).

Ligands of the vitamin D receptor (VDR) were also shown to affect negatively apoA-I gene expression in hepatic cells (Wehmeier et al. 2005). In VDR KO mice, serum HDL-C levels were 22 % higher and the mRNA levels of apoA-I were 49.2 % higher compared with WT mice. The mechanisms by which VDR ligands affect HDL levels remain unclear (Wang et al. 2009).

1.2.1 The Role of the Distal Enhancer in apoA-I Gene Transcription

In addition to its own promoter, optimal expression of the human apoA-I gene in hepatic and intestinal cells requires the presence of a 200 bp transcriptional enhancer element located downstream of the apoA-I gene, 500 bp upstream of the first exon of the adjacent apoC-III gene. This regulatory region, which coordinates the expression of all three genes of the apoA-I/C-III/A-IV cluster, contains two hormone response elements that bind HNF-4 and different combinations of ligand-dependent nuclear receptors as well as two binding sites for the ubiquitous transcription factor specificity protein 1 (Sp1) (Kardassis et al. 1997; Lavrentiadou et al. 1999). The mutagenesis of the HREs and of the Sp1 sites reduced the activity of the apoA-I promoter/C-III enhancer cassette in cell cultures and abolished the binding of the corresponding factors (Kardassis et al. 1997; Lavrentiadou et al. 1999).

The contribution of the HREs and the Sp1 binding sites to the tissue-specific expression of the apoA-I gene in vivo was addressed using transgenic mice bearing the WT apoA-I/apoC-III gene cluster under the control of their regulatory regions or the same cluster bearing mutations in different regulatory elements (Georgopoulos et al. 2000; Kan et al. 2000, 2004). It was shown that mutations in one of the two HREs of the enhancer (element I4) abolished the intestinal expression and reduced the hepatic expression of the adjacent apoA-I gene to 20 % of the control. Mutations in the two HREs of the proximal apoA-I promoter reduced the hepatic and intestinal expression of the apoA-I gene to approximately 15 % of the control, whereas combined mutations in all three HREs totally eliminated the intestinal and hepatic expression of the apoA-I gene (Kan et al. 2000). Studies in cell cultures established that HNF-4 and Sp1 factors are both required for the synergy between the apoA-I promoter and the enhancer by physically interacting with each other and forming transcriptional complexes in order to facilitate the recruitment of the basal transcriptional machinery (Kardassis et al. 2002). The aforementioned mouse model that expresses human apoA-I under its own promoter

and enhancer (Kan et al. 2000) is very useful for the in vivo characterization of the mechanisms that regulate the expression of the apoA-I gene under physiological or pathological conditions as well as for the identification and validation of novel compounds that are designed to upregulate human apoA-I gene transcription and serve as HDL-raising drugs. This is especially important in light of the differences between the mouse and the human apoA-I promoters. For instance, the mouse gene cannot be upregulated by fibrates due to a three base pair difference in the PPRE compared to the human promoter which responds to 0.2 % fibrates but not to 0.03 % fibrates as mentioned above.

1.2.2 Other Factors Regulating apoA-I Gene Transcription

Further upstream from the two apoA-I HREs, an insulin response core element (IRCE) was identified and shown to bind Sp1 (Murao et al. 1998). Insulin-activated signaling pathways including the Ras/raf and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) have been shown to posttranslationally modify Sp1, and this leads to increased apoA-I promoter activity (Mooradian et al. 2004).

Early growth response protein 1 (EGR-1) is another transcription factor that regulates apoA-I expression via the proximal HREs (Kilbourne et al. 1995; Cui et al. 2002). Mice with experimental nephrotic syndrome are characterized by a fivefold increase in the levels of EGR-1, and these changes were associated with high plasma apoA-I and HDL-C levels as well as apoA-I gene transcription in the liver (Zaiou et al. 1998). In line with these findings, mice deficient in EGR-1 have reduced plasma HDL-C and apoA-I as well as hepatic apoA-I mRNA levels (Zaiou et al. 1998). EGR-1 was shown to mediate the response of the apoA-I promoter to estrogens (Hargrove et al. 1999).

The proximal apoA-I promoter also contains one element that binds the basic leucine zipper (bZip) factor CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and nuclear factor Y (NFY) and another element that binds hepatocyte nuclear factor-3β/FOXA2 (Papazafiri et al. 1991; Novak and Bydlowski 1997). Nuclear factor HNF-3β was shown to mediate the response of the apoA-I promoter to glucocorticoids (Hargrove et al. 1999).

Several natural compounds with antioxidant, pro-estrogenic, or other activities were shown to affect apoA-I and HDL-C levels, and these studies are summarized in Haas and Mooradian (2010).

Pro-inflammatory cytokines including tumor necrosis factor α (TNFα) and interleukin-1β (IL-1β) were previously shown to inhibit apoA-I gene expression both in cell cultures and in animals (Ettinger et al. 1994; Song et al. 1998). Furthermore, plasma levels of HDL-C and apoA-I were shown to be highly increased in mice deficient in the p50 subunit of the pro-inflammatory transcription factor NF-κB (Morishima et al. 2003). In agreement with this observation, the activation of NF-κB by lipopolysaccharide (LPS) caused a reduction in apoA-I mRNA and protein levels in HepG2 cells, whereas the inhibition of NF-κB via adenovirus-mediated overexpression of IκBα abolished the reduction (Morishima et al. 2003). This IκBα-induced apoA-I increase was blocked by preincubation with MK886, a selective inhibitor of peroxisome proliferator-activated receptor α, and

mutations in the PPARα binding site in the apoA-I promoter abrogated these changes (Morishima et al. 2003). In a recent study, it was shown that apoA-I promoter activity in HepG2 cells is inhibited by TNFα in a c-Jun-dependent manner but no AP1-responsive element within the apoA-I promoter was reported to mediate this effect (Parseghian et al. 2013). The inhibition of the expression of apoA-I and other HDL genes in hepatocytes during inflammation could also be mediated by HNF-4 which was previously shown to be negatively regulated by the TNFα/NF-κB signaling pathway by physically interacting with NF-κB (Nikolaidou-Neokosmidou et al. 2006).

1.3 Transcriptional Regulation of the ABCA1 Gene

The gene encoding the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) is expressed in the liver, small intestine, macrophages, kidney, and various other tissues (Langmann et al. 1999, 2003; Kielar et al. 2001; Wellington et al. 2002). ABCA1 is an important regulator of HDL biogenesis in the liver and facilitates the removal of excess cholesterol from macrophages.

ABCA1 is particularly abundant in macrophages (Langmann et al. 1999). ABCA1 expression in macrophages has little influence on HDL-C plasma levels (Haghpassand et al. 2001) but is an important factor in the prevention of cholesterol accumulation in the macrophages found in the atherosclerotic plaque and their transformation into foam cells (Aiello et al. 2002). ABCA1 mRNA and protein are very unstable, having a half-life of 1–2 h in murine macrophages (Wang and Oram 2002). Fine-tuning regulatory mechanisms (transcriptional regulation as well as posttranscriptional and posttranslational modifications) are involved to ensure the constant and inducible ABCA1 expression in macrophages. In this section, we will focus on the transcriptional regulation of the ABCA1 gene with emphasis on macrophages. Posttranscriptional and posttranslational regulation of this gene will be discussed in later sections.

The human ABCA1 gene mapped to chromosome 9q31.1 is composed of 50 exons, which encode 2261-amino-acid residues (Santamarina-Fojo et al. 2000). The ABCA1 gene promoter contains a TATA box localized 24 bp upstream of the transcription initiation site, essential for promoter activity in macrophages as well as in hepatocytes (Langmann et al. 2002). The engagement of alternative promoters and transcription initiation sites localized upstream of the first exon or inside the first intron of the gene enables the inducible and tissue-specific expression regulation of ABCA1 gene (Huuskonen et al. 2003; Singaraja et al. 2005). In addition, other transcriptional response elements of the promoter influence the constitutive and tissue-specific expression of ABCA1 (Fig. 2).

1.3.1 Upregulatory Mechanisms of ABCA1 Gene Expression

The major transcription factors that upregulate ABCA1 gene expression in macrophages are the nuclear receptors liver X receptors α and β (LXRα and LXRβ), both expressed by this cell type. LXRs heterodimerize with the retinoic

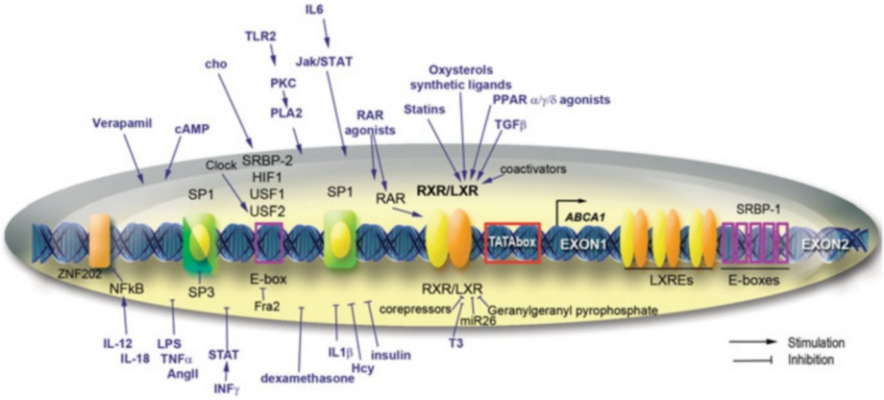


Fig. 2 Regulatory regions, transcription factors, and signaling molecules (cytokines, growth factors, metabolites, drugs) that modulate the expression of the ABCA1 gene in macrophages and other tissues. *Arrows* and *block lines* denote activation and repression, respectively. The mechanisms are described in detail in the text. Abbreviations: retinoic acid receptor (RAR); retinoid X receptor (RXR); liver X receptor (LXR); sterol regulatory element-binding protein (SREBP); specificity protein 1 (Sp1); tumor necrosis factor α (TNFα), interleukin (IL); lipopolysaccharide (LPS); interferon γ (IFNγ); angiotensin II (AngII); nuclear factor kappa beta (NF-κB); upstream stimulatory factor (USF); hypoxia-inducible factor (HIF); transforming growth factor β (TGFβ); peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR); Janus kinase (Jak); signal transducer and activator of transcription (STAT)

X receptor (RXRα) to bind to the direct repeats separated by four nucleotides (direct repeat 4; DR4 elements) found at position −62/−47 of the ABCA1 promoter (Costet et al. 2000). Additional but not well-characterized LXREs are present at the intron 1 promoter of the ABCA1 gene (Singaraja et al. 2001). Since the LXRα promoter is subject to autoregulation, the LXR-mediated gene expression is auto-amplified (Laffitte et al. 2001a). The natural ligands of LXR are several hydroxylated derivatives of cholesterol (oxysterols) and include 27-hydroxycholesterol (Schwartz et al. 2000; Fu et al. 2001), 22(R)-hydroxycholesterol (Costet et al. 2000), 20(S)-hydroxycholesterol (Schwartz et al. 2000), and desmosterol (Yang et al. 2006). Among these ligands, 27-hydroxycholesterol which is endogenously produced by the action of CYP27A1 enzyme represents the sensor of cholesterol loading in macrophages. In addition to these natural ligands, synthetic LXR ligands such as TO901317 have also been developed. These synthetic LXR agonists upregulate ABCA1 in cultured macrophages more efficiently than cholesterol loading via modified LDL particles (Sparrow et al. 2002).

LXR tissue-selective gene transcription is dependent on co-regulatory proteins. For example, data showed that the activation of the ABCA1 promoter by LXRα/RXRα heterodimers and their ligands require Sp1 (Thymiakou et al. 2007). The overexpression of Sp1 increased ABCA1 mRNA level in HeLa cells and enhanced cellular cholesterol and phospholipid efflux in RAW 246.7 macrophages. Gel shift experiments revealed in vitro binding of Sp1 to −85/−91 and −151/−156 GC

boxes. Moreover, it was shown that Sp3 competed with Sp1 for binding to the latter GC box, acting as a repressor (Langmann et al. 2002). Physical interactions between Sp1 and LXRα require the N-terminal region of LXRα, which includes the DNA-binding domain and two different domains of Sp1: the transactivation domain B and the DNA-binding domain (Thymiakou et al. 2007). LXR agonists, such as the natural steroidal ligand 22(R)-hydroxycholesterol and the weak non-steroidal ligand GSK418224, differentially recruit coactivators and corepressors compared with full LXR agonists, such as the nonsteroidal ligand T0901317 (Albers et al. 2006; Peng et al. 2008, 2011; Phelan et al. 2008). The synthetic oxysterol N, N-dimethyl-3β-hydroxycholenamide (DMHCA) caused a differential induction of the ABCA1 and the sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c genes in hepatic and macrophage cell lines, as well as in mice (Quinet et al. 2004). In cholesterol-loaded or unloaded peritoneal macrophages, DMHCA increased ABCA1 mRNA, whereas SREBP-1c mRNA levels were downregulated (Quinet et al. 2004). Cineole, a small aromatic compound found in teas and herbs, considerably stimulated the transactivation potential of LXRα and LXRβ and induced ABCA1 expression in macrophages but significantly reduced the expression of LXRα- and LXRα-responsive genes in hepatocytes (Jun et al. 2013). Another LXR agonist, ATI-111, had a strong effect on ABCA1 expression in macrophages as well as in the intestine and small effect on ABCA1 expression in the liver. ATI-111 significantly stimulated SREBP-1c mRNA in some tissues but inhibited the conversion of SREBP-1c precursor form into its active form (Peng et al. 2011).

These findings revealed that LXR agonists have a promising potential for the upregulation of the ABCA1 transporter and the promotion of the cellular lipid efflux capacity of macrophages. Due to the concomitant LXR-mediated upregulation of two genes involved in the fatty acid biosynthesis, fatty acid synthase (Joseph et al. 2002a), and SREBP-1c (Yoshikawa et al. 2001), the development of LXR agonists for therapeutic uses has been limited by their adverse effects that include hepatic steatosis and hypertriglyceridemia. In order to dissociate the positive effects of LXR agonists on cholesterol homeostasis from the adverse effects on fatty acid metabolism, the next step will be the discovery of new LXRβ-selective agonists and the synthesis of novel tissue-specific LXR ligands with weaker transcriptional effects on SREBP-1c. SREBP-1a, a different member of the SREBP family of proteins, binds to several sites present inside intron 1; however, the role of these elements in ABCA1 gene regulation is still unknown (Thymiakou et al., unpublished observations) (Fig. 2).

Besides LXR, other nuclear receptors and transcription factors are involved in ABCA1 gene regulation in macrophages. Retinoic acid receptor (RAR) activators such as all-*trans*-retinoic acid and 4-[(E)-2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-1-propenyl]benzoic acid (arotinoid acid) were found to increase ABCA1 mRNA and protein levels in macrophages (Costet et al. 2003). Co-transfection experiments showed that the same DR4 promoter element of the ABCA1 promoter binds RXR heterodimers in the following order: RARγ/RXRα bound stronger and activated the human ABCA1 promoter, and RARα/RXRα bound weaker, while no RARβ/RXRα binding was detected. However, in

macrophages from RARγ$^{-/-}$ mice, arotinoid acid still induced ABCA1 gene expression and caused marked upregulation of RARα, suggesting that high levels of RARα can compensate for the absence of RARγ (Costet et al. 2003).

Peroxisome proliferator-activated receptors α (PPARα) and γ (PPARγ) are both expressed in human macrophages where they exert anti-inflammatory effects. The hydroxylated derivative of linoleic acid, 13-hydroxy linoleic acid, a natural PPAR agonist, and pioglitazone (PPARγ agonist) increased PPAR transcriptional activity and induced ABCA1 gene expression in macrophages (Kammerer et al. 2011; Ozasa et al. 2011). However, data suggest that these effects are indirect and most probably are mediated by LXRα (Chinetti et al. 2001). PPARδ activators appeared to induce ABCA1 gene expression and cholesterol efflux moderately and to increase HDL levels in an obese-monkey model (Oliver et al. 2001).

Recent data showed that Clock, a key transcription factor that controls circadian rhythm, is involved in ABCA1 regulation in macrophages (Pan et al. 2013). The dominant-negative Clock mutant protein (ClockΔ19/Δ19) enhanced plasma cholesterol and atherosclerosis. Mutant ClockΔ19/19/apoE$^{-/-}$ mice had macrophage dysfunction, expressed low levels of ABCA1, and had higher levels of scavenger receptors. Molecular studies revealed that Clock regulated ABCA1 expression in macrophages by modulating the activity of upstream stimulatory factor 2 (Pan et al. 2013).

Experimental data showed that signaling molecules upregulate ABCA1 expression in macrophages, but the fine-tuning mechanism of modulation and the regulatory regions involved remain to be elucidated. Transforming growth factor β1 (TGFβ1) increased ABCA1 mRNA levels in cholesterol-loaded macrophages (Argmann et al. 2001; Panousis et al. 2001). It was demonstrated that in THP-1 macrophage-derived foam cells, the LXRα pathway is involved in TGFβ-mediated upregulation of ABCA1 expression (Hu et al. 2010b). Interleukin-6 (IL-6) significantly increased ABCA1 at both the mRNA and protein levels. This effect was abolished by selective inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway (Frisdal et al. 2011). ABCA1 mRNA levels were significantly increased by estradiol treatment of macrophages for a short period of time, suggesting a direct activation of the ABCA1 promoter via the estrogen receptor β (Schmitz and Langmann 2005). Membrane-permeable analogues of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) induced the ABCA1 mRNA in macrophages and other cells by an unknown mechanism (Lin and Bornfeldt 2002). Inhibitors that are able to block the action of phosphodiesterase 4 on cAMP have been found to increase ABCA1 mRNA and cellular cholesterol efflux (Lin and Bornfeldt 2002). Verapamil, a calcium channel blocker, enhanced ABCA1 transcription by an LXR-independent process (Suzuki et al. 2004). Toll-like receptor 2 agonist Pam(3)CSK(4) upregulated ABCA1 gene expression in RAW 264.7 macrophages via the activation of the PKCη/phospholipase D2 signaling pathway (Park et al. 2013). S-Allylcysteine, the most abundant organosulfur compound in aged garlic extract, also elevated ABCA1 content in human THP-1 macrophages (Malekpour-Dehkordi et al. 2013). The data showed that stimulation with CXCL5 that has a protective role in atherosclerosis (Rousselle

et al. 2013) induced ABCA1 expression in alternatively activated (M2) macrophages but not in classically activated (M1) macrophages.

1.3.2 Negative Regulation of ABCA1 Gene Transcription

The thyroid hormone T3 strongly suppressed ABCA1 gene transcription (Huuskonen et al. 2004). It was demonstrated that T3 significantly inhibited the ability of oxysterols to activate LXR. Moreover, the TR/RXR heterodimers competed with LXR/RXR for the DR4 element in the ABCA1 promoter (Huuskonen et al. 2004). A reciprocal negative cross talk exists between LXRs and STAT1 based on the competition for CREB-binding protein (Pascual-Garcia et al. 2013). This may explain the IFNγ-mediated downregulation of ABCA1 in cholesterol-loaded macrophages (Panousis and Zuckerman 2000; Argmann et al. 2001; Ma et al. 2013). Moreover, TNFα downregulates ABCA1 as well as LXRα expression in macrophages via a PKCθ-dependent pathway (Ma et al. 2013).

Unsaturated fatty acids decrease the expression of ABCA1 in RAW 264.7 macrophages by a mechanism that involves LXR/RXR binding to the promoter (Uehara et al. 2007) and by modulation of the histone acetylation state (Ku et al. 2012). In MCSF-activated human monocytes, linoleic acid decreases ABCA1 gene expression (Mauerer et al. 2009). Geranylgeranyl pyrophosphate, a product of the mevalonate pathway that is used for protein isoprenylation, suppresses LXR-induced ABCA1 synthesis in two ways: as an antagonist of the LXR interaction with the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and as an activator of Rho GTP-binding proteins (Gan et al. 2001).

Among the transcription factors that downregulate ABCA1 expression in macrophages in an LXR-independent manner is the SCAN domain-containing zinc finger transcription factor ZNF202 which binds to a GnT motif in the region −234/−215 of the ABCA1 promoter (Porsch-Ozcurumez et al. 2001). High intracellular levels of ZNF202 prevented LXR/RXR-mediated induction of the ABCA1 promoter in response to oxysterols (Porsch-Ozcurumez et al. 2001).

The conserved E-box at position −140 binds transcription factors that modulate the ABCA1 gene expression. Experimental data indicated that upstream stimulatory factors (USF) 1 and 2, hepatocyte nuclear factor-1α (HNF-1α), and fos-related antigen (Fra)2 bind to the intact E-box of the human ABCA1 promoter and differentially modulate the gene expression: USF1 and USF2 enhanced and Fra2 repressed ABCA1 promoter activity (Langmann et al. 2002; Yang et al. 2002). The same E-box element also binds the sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP-2), a key regulator of cholesterol metabolism, which suppresses ABCA1 gene transcription in response to cholesterol depletion (73).

ABCA1 gene expression was severely decreased in the liver and peritoneal macrophages of diabetic mice (Uehara et al. 2002). This observation was explained using in vitro models in which it was revealed that acetoacetate downregulates ABCA1 mRNA and protein in HepG2 hepatocytes and RAW 264.7 macrophages (Uehara et al. 2002) and thus high glucose concentration decreases ABCA1 gene expression in MCSF-activated monocytes (Mauerer et al. 2009). Data showed that

the treatment of THP-1 macrophages with 100 nM dexamethasone, a potent synthetic ligand of the glucocorticoid receptor, decreases the expression of the ABCA1 gene (Sporstol et al. 2007).

LPS downregulates ABCA1 in macrophages; this inhibition was reverted by the treatment with betulinic acid acting via the downregulation of miR-33 and suppression of NF-κB pathway (Zhao et al. 2013). IL-18 and IL-12 synergistically decrease ABCA1 levels in THP-1 macrophage-derived foam cells through the IL-18 receptor/NF-κB/ZNF202 signaling pathway (Yu et al. 2012). ABCA1 expression was strongly suppressed by angiotensin (Ang) II at both mRNA and protein levels in a dose-dependent manner in THP-1-derived macrophages, whereas ABCG1 expression was not affected. The effect of Ang II on ABCA1 expression could be mediated by the angiotensin II type 1 (AT1) receptor (Chen et al. 2012a). It was demonstrated that clinically relevant concentrations of homocysteine (Hcy) decreased the mRNA and protein expression levels of ABCA1 in macrophages. It was revealed that mRNA expression and the activity of DNA methyltransferase were increased by Hcy, which may explain the higher DNA methylation level of ABCA1 gene in macrophages incubated with Hcy (Liang et al. 2013).

1.4 Transcriptional Regulation of the ABCG1 Gene

ABCG1 mediates cholesterol removal from macrophages to HDL particles, but not to lipid-free apoA-I (Kennedy et al. 2005; Fitzgerald et al. 2010). Although recent data showed that the combined macrophage deficiency of ABCA1/G1 is pro-atherogenic, probably by promoting plaque inflammation (Westerterp et al. 2013), the data concerning the role of ABCG1 expression in macrophages is controversial. Two independent groups reported that $LDLR^{-/-}$ mice lacking macrophage ABCG1 show decreased atherosclerotic lesions (Baldan et al. 2006; Ranalletta et al. 2006), while others reported that the absence of macrophage ABCG1 causes a modest increase in atherosclerotic lesions (Out et al. 2006). These contradictory results may be explained by recent data showing that the absence of ABCG1 leads to increased lesions in early stages of atherosclerosis but causes retarded lesion progression in more advanced stages of atherosclerosis in $LDLR^{-/-}$ mice, suggesting that the influence of ABCG1 deficiency on lesion development depends on the stage of atherogenesis (Meurs et al. 2012).

The human ABCG1 gene has been mapped to chromosome 21q22.3 and encodes for a 678-amino-acid protein of 75.5 kDa molecular mass (Chen et al. 1996). The ABCG1 gene spans more than 70 kb and includes 15 exons, each containing between 30 and 1,081 bp, while the intron size is between 137 bp and more than 45 kb. All exon-intron boundaries display the canonical GT/AG sequences. In contrast to the ABCA1 gene, the ABCG1 gene does not contain a canonical TATA box in the promoter (Langmann et al. 2000).

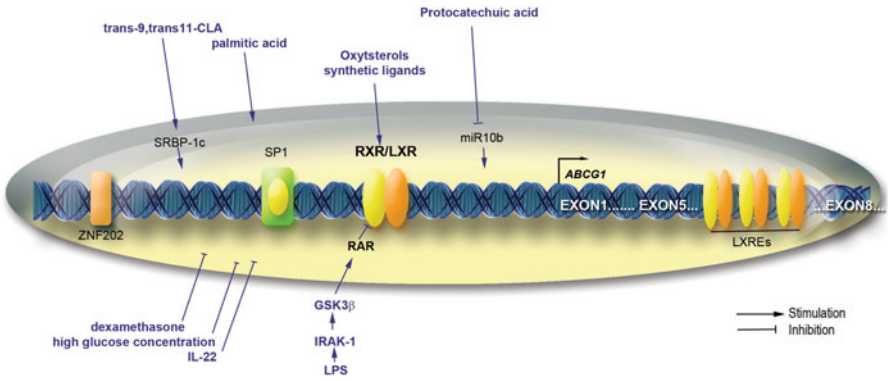


Fig. 3 Regulatory regions, transcription factors, and signaling molecules (cytokines, growth factors, metabolites, drugs) that modulate the expression of the ABCG1 gene. *Arrows* and *block lines* denote activation and repression, respectively. The mechanisms are described in detail in the text. Abbreviations: conjugated linoleic acid (CLA); glycogen synthase kinase 3β (GSK3β); sterol regulatory element-binding protein (SREBP); specificity protein 1 (Sp1)

The regulation of ABCG1 expression has similarities with that of ABCA1 (Fig. 3). Thus, LXR plays an important role in ABCG1 promoter activation. Experimental data indicated that various LXR ligands upregulate ABCG1 expression. ATI-111, a novel steroidal LXR agonist, induces ABCG1 mRNA expression in peritoneal macrophages more potently than T0901317 and inhibits its expression in the liver, suggesting tissue selectivity (Peng et al. 2011). Different natural compounds, such as cineole and fucosterol that are LXR activators, are able to increase ABCG1 levels in macrophages (Hoang et al. 2012; Jun et al. 2013). Recent data showed that the knockdown of LXRα impaired cholesterol efflux in human primary macrophages, while LXRβ silencing had no detectable impact on the expression of LXR target genes such as ABCA1 and ABCG1 and did not affect cholesterol efflux (Ishibashi et al. 2013). The indirect effects of LXR in ABCG1 regulation were recently shown. Adiponectin treatment significantly increased ABCG1 mRNA and protein levels in macrophages from diabetic patients, whereas the pharmacological or genetic inhibition of LXR abrogated this enhancement; these data demonstrated that the mechanism of adiponectin-mediated upregulation of ABCG1 includes LXRα (Wang et al. 2013b). Similar with ABCA1, TGFβ upregulates the expression of ABCG1, while unsaturated fatty acids suppress ABCG1 expression via the LXR pathway (Uehara et al. 2007; Hu et al. 2010b).

The analysis of potential regulatory elements in the promoter region carried out using the MatInspector program identified multiple Sp1 sites at positions −184, −382, and −566, an AP2 binding site at position −222, a NF-κB site at position −338, an E-box motif at position −233, a sterol regulatory element at position −660, and the NFY binding site at position −198 in ABCG1 proximal promoter (Langmann et al. 2000). A functional genetic variant of the ABCG1 promoter associated with an increased risk of myocardial infarction and ischemic heart disease in the general population was revealed (Schou et al. 2012). This study

showed that the ABCG1 expression was decreased by approximately 40 % in g.-376C>T heterozygotes versus noncarriers. This gene polymorphism is included in a Sp1 binding site located at position −382/−373 in the ABCG1 promoter. Thus, the presence of the −376 T allele reduced the binding and transactivation of the promoter by Sp1, leading to a decreased ABCG1 expression (Schou et al. 2012).

ZNF202 was identified as a transcriptional repressor of ABCG1 gene which binds at position −560 in the ABCG1 promoter (Porsch-Ozcurumez et al. 2001).

Recently, microbiotic and dietary factors were shown to regulate the ABCG1 expression. Protocatechuic acid (PCA), a gut microbiota metabolite of cyanidin-3 formed by 0-β-glucoside, exerts an anti-atherogenic effect partially through the inhibition of miR-10b-mediated downregulation of ABCG1 expression (Wang et al. 2012a). Extra-virgin olive oil intake has been shown to improve the capacity of HDL to mediate cholesterol efflux and increased ABCG1 and ABCA1 expression in human macrophages (Helal et al. 2013). Conjugated linoleic acids (CLAs) are minor components of the diet with many reported biological activities. It was revealed that in MCSF-differentiated monocytes, *trans*-9,*trans*-11-CLA, but not *cis*-9,*trans*-11-CLA and *trans*-10,*cis*-12-CLA, activated ABCG1 via SREBP-1c (Ecker et al. 2007). In addition, it was demonstrated that palmitic acid upregulates the ABCG1 gene, while high glucose concentration decreased ABCG1 gene expression in MCSF-activated human monocytes (Mauerer et al. 2009).

Among the downregulators of ABCG1, low doses of LPS strongly reduce the expression of ABCG1 in bone marrow-derived macrophages through IL-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK-1)/glycogen synthase kinase 3β (GSK3β)/retinoic acid receptor α (RARα) signaling pathway (Maitra and Li 2013). HMG-CoA reductase inhibitors, simvastatin and atorvastatin, decreased ABCG1-mediated cholesterol efflux in human macrophages, despite the fact that the protein expression remained unaltered (Wang et al. 2013c). In THP-1 monocytes, 100 nM dexamethasone, a synthetic glucocorticoid, inhibited the mRNA expression of ABCG1, although the glucocorticoid receptor expression was very low in this cell line (Sporstol et al. 2007). IL-22, a member of the IL-10 cytokine family secreted primarily by Th17 and Th22 subsets of T lymphocytes, was induced by S100/calgranulin and impaired cholesterol efflux in macrophages by downregulation of ABCG1 (Chellan et al. 2013).

1.5 Transcriptional Regulation of the Apolipoprotein E Gene

Apolipoprotein E (apoE), a glycoprotein of 35 kDa, plays an important role in plasma cholesterol level regulation and in cholesterol efflux, as documented by studies in patients and animal models with apoE deficiency or mutated apoE genes (Nakashima et al. 1994; Linton et al. 1995; von Eckardstein 1996; Van Eck et al. 1997; Grainger et al. 2004; Ali et al. 2005; Davignon 2005; Raffai et al. 2005). ApoE is mainly synthesized by the liver but also by various cells and peripheral tissues (Zannis et al. 2001b). ApoE is a marker for the developmental state of macrophages; the culture of mouse bone marrow cells in vitro showed that

mature macrophages, but not their monocytic precursors, synthesized apoE (Werb and Chin 1983c). At the site of atherosclerotic lesion, apoE is provided by infiltrated macrophages. Transgenic mice expressing apoE only in macrophages are protected against atherosclerosis, even though the plasma levels of apoE are exceedingly low and the animals are hypercholesterolemic (Bellosta et al. 1995). In contrast, transgenic mice with normal levels of apoE in plasma, but not in macrophages, are more susceptible to atherosclerosis (Fazio et al. 1997). ApoE secreted by macrophages within the atherosclerotic plaque facilitates the cholesterol efflux to exogenous acceptors (such as HDL), thus assisting the reverse cholesterol transport to the liver. The uptake of acetylated LDL or cholesterol ester-rich β-VLDL into peritoneal macrophages stimulates apoE synthesis and secretion (Basu et al. 1981).

The human apoE gene is located on chromosome 19 at the 5′ end of a cluster containing also apoC-I, apoC-IV, and apoC-II genes (Myklebost and Rogne 1988; Smit et al. 1988; Allan et al. 1995a, b). The regulation of apolipoprotein E gene transcription is a highly complex process and requires the interaction of transcription factors with the proximal promoters but also with the distal regulatory regions (Fig. 4).

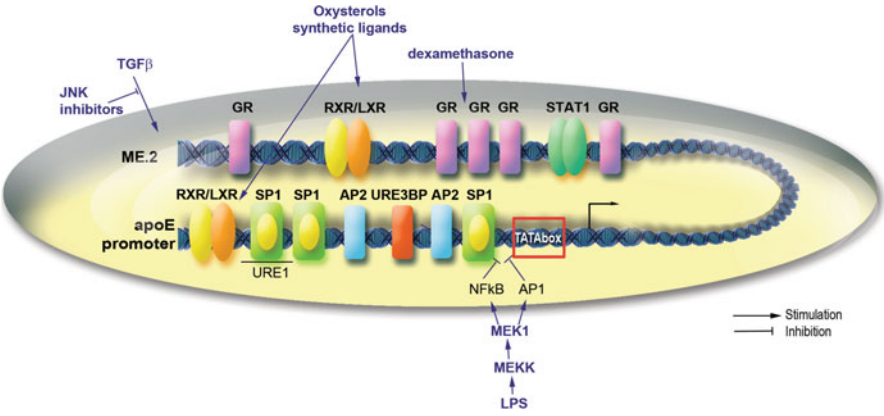


Fig. 4 Regulatory regions, transcription factors, and signaling molecules (cytokines, growth factors, metabolites, drugs) that modulate the expression of the apoE gene. *Arrows* and *block lines* denote activation and repression, respectively. The mechanisms are described in detail in the text. Abbreviations: glucocorticoid receptor (GR); signal transducer and activator of transcription (STAT); Jun N-terminal kinase (JNK); retinoid X receptor (RXR); liver X receptor (LXR); specificity protein 1 (Sp1); activator protein 2 (AP2); nuclear factor kappa beta (NF-κB); upstream regulatory region 3 binding protein (URE3BP); lipopolysaccharide (LPS); multienhancer 2 (ME.2); transforming growth factor β (TGFβ)

1.5.1 Proximal Regulatory Binding Sites Involved in the apoE Gene Expression

The proximal apoE promoter is well conserved in humans and mice, having the same localization of TATA box and GC box (Rajavashisth et al. 1985; Horiuchi et al. 1989). Multiple positive and negative elements that modulate apoE gene expression have been detected on the apoE promoter, using different in vitro systems (Larkin et al. 2000; Zannis et al. 2001b). Smith et al. analyzed the apoE promoter in both expressing (HepG2) and non-expressing (HeLa) cells (Smith et al. 1988). Within the proximal 5′-flanking sequence and the first intron, eight regions were identified which had a positive effect and three regions with a negative effect on apoE expression, in both HepG2 and HeLa cells (Smith et al. 1988). The proximal apoE promoter contains a GC box transcriptional control element at −59/−45, a nonspecific enhancer element at −366/−246, an upstream regulatory element (URE1) at −193/−124, and a downstream regulatory element at +44/+262 (Paik et al. 1988). Within URE1, a sequence spanning −161/−141, defined as a positive element for transcription, has the ability to act alone as an enhancer element (Chang et al. 1990). This element interacts with Sp1 transcription factor that constitutively binds the GC box motif, suggesting that Sp1 may play an important role in the basal level of apoE expression, as well as in the activity of this enhancer element. Another regulatory element, termed URE3, was identified at position −101/−89 and found to bind a 300 kDa protein from placental nuclear extracts termed URE3 BP (Jo et al. 1995). DNase I footprinting revealed the existence of two binding sites for recombinant AP2 in the regions from −48/−74 and from −107/−135 of the apoE promoter (Olaisen et al. 1982; Smith et al. 1988; Garcia et al. 1996; Salero et al. 2001, 2003). Gel mobility-shift assays showed the direct binding of LXRα/RXRα and LXRβ/RXRα to a low-affinity LXRE present in the region −494/−465 of the proximal promoter (Laffitte et al. 2001b). Other studies revealed that USF binds to an atypical E-box located in the −101/−91 region of the apoE promoter (Salero et al. 2003). The same group found that Zic1 and Zic2 transcription factors can bind to three binding sites located at −65/−54, −136/−125, and −185/−174 in the apoE promoter and stimulate apoE gene expression (Salero et al. 2001).

Bacterial endotoxin and other inflammatory agents decrease apoE production (Werb and Chin 1983a, b; Gafencu et al. 2007). The apoE downregulation in macrophages impaired the local beneficial effect of apoE during the plaque development. As a result, despite the fact that macrophages are present in the lesion, their ability to regress atherosclerosis is seriously compromised. We have previously reported the mechanisms of apoE downregulation in macrophages exposed to inflammatory conditions, similar to those found at the atherosclerotic site (Gafencu et al. 2007). Tumor progression locus 2 (Tpl2) and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 1 (MEKK1) were identified as the kinases that are primarily responsible for the downregulation of apoE promoter activity by LPS. Tpl2 and MEKK1 signaling pathways converge to NF-κB and AP1, acting on the apoE core promoter −55/+73 (Gafencu et al. 2007).

1.5.2 Distal Regulatory Binding Sites That Modulate apoE Gene Expression in Macrophages

Despite this complex transcription factor machinery that may be targeted to the apoE promoter, the promoter itself lacks the ability to direct gene transcription in vivo in any cells, in the absence of the distal enhancers (Shih et al. 2000). In many tissues, cell-specific distal enhancers regulate the expression of genes in the apoE/apoC-I/apoC-I′/apoC-IV/apoC-II gene cluster (Shih et al. 2000). The expression of apoE in macrophages is controlled by two homologous enhancers (95 % identical in sequence), designated as multienhancer 1 (ME.1) and multienhancer 2 (ME.2), containing 620 and 619 nucleotides, respectively (Shih et al. 2000). These enhancers are located at 3.3 and 15.9 kb downstream of the apoE gene, respectively. We demonstrated by chromosome conformational capture (3C) and transient transfections that both ME.1 and ME.2 can interact with the apoE promoter only in phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-differentiated macrophages, but not in undifferentiated monocytes (Trusca et al. 2011). The results showed that the interactions take place in antisense orientation of the promoter and ME.1/2. Our data obtained using a series of deletion mutants of the promoter or of the ME.2 identified the fragment −100/+73 as the minimal region of the apoE promoter that is activated by the ME.2. We showed that the entire sequence of ME.2 is necessary for an optimal interaction with the apoE promoter, but the 5′ region of ME.2 is more important than 3′ region for enhancing apoE promoter activity (Trusca et al. 2011). The interaction of the apoE promoter with ME.1/2 facilitates the transcriptional enhancement of the apoE gene by various transcription factors.

LXRα and LXRβ and their oxysterol ligands are key regulators of apoE expression in macrophages (Laffitte et al. 2001b; Joseph et al. 2002b; Mak et al. 2002b). The ability of oxysterols and synthetic ligands to regulate apoE expression in peritoneal macrophages as well as in adipose tissue is reduced in LXRα$^{-/-}$ or LXRβ$^{-/-}$ mice and abolished in double knockouts. However, basal expression of apoE is not compromised in LXR null mice, suggesting that LXRs mediate lipid-inducible expression rather than tissue-specific expression of this gene (Laffitte et al. 2001b). Data revealed that LXR/RXR binds to a low-affinity LXRE present in the apoE promoter as well as a high-affinity site conserved in both human ME.1 and ME.2 (Laffitte et al. 2001b). Experimental data revealed that the ligand activation of the LXR/RXR heterodimer enhanced the activity of the reporter constructs under the control of human ME.1 or ME.2 fused to the apoE proximal promoter (Laffitte et al. 2001b). Oxysterol-binding protein-related protein 1S (ORP1S) translocates from the cytoplasm to the nucleus in response to sterol binding and then binds to LXRs, promoting the binding of LXRs to LXREs. Thus, ORP1S mediates the LXR-dependent transcription via the ME.1 and ME.2 of the apoE gene (Lee et al. 2012). An interesting finding was that the induction of apoE gene expression by LXR agonists is attenuated by inhibitors of JNK and PI3K pathways (Huwait et al. 2011). A similar inhibition was noticed in the case of TGFβ-induced expression of apoE, which was prevented by pharmacological inhibitors of JNK, p38 kinase, and casein kinase 2 (Singh and Ramji 2006).

The synthetic glucocorticoid receptor (GR) ligand, dexamethasone, increased apoE mRNA levels in mature macrophages up to sixfold over basal levels (Zuckerman et al. 1993). In silico analysis of the ME.1 and ME.2 revealed some transcription factor binding motifs for the GR (Shih et al. 2000). The presence of these GR binding sites in the multienhancers may explain the apoE upregulation by GR ligands, but the biological activity of these GR biding sites remains to be revealed.

TRANSFAC analysis of the apoE promoter, ME.1, and ME.2 showed that STAT1 transcription factor has a binding site only on the ME.2. Our data showed that this binding site is biologically active and STAT1 specifically upregulates apoE gene expression via ME.2, in macrophages, but not in hepatocytes. The STAT1 binding site was located in the 174/182 region of ME.2 (Trusca et al. 2011). Interestingly, a simultaneous increase in the expression of apoE and STAT1 was recorded after monocyte differentiation with PMA treatment (for 4 h). Our model proposed that after DNA bending, which probably takes place during monocyte differentiation, STAT1 bound on ME.2 interacts with the transcription initiation complex, leading to the activation of apoE expression. In addition, STAT1 can interact and cooperate with other transcription factors bound on the ME.2 or on the apoE promoter, for the modulation of apoE gene expression. Recently, we have revealed that STAT1 can interact with RXR and modulate gene expression of the apoC-II gene (Trusca et al. 2012). Since RXRα binds to the ME.2, we can speculate that apoE expression in macrophages may be modulated by the STAT1-RXRα interactions, similarly with apoC-II.

1.6 Transcriptional Regulation of the Human apoM Gene in the Liver

Apolipoprotein M (apoM) belongs to the lipocalin protein superfamily and differs from typical water-soluble apolipoproteins by its tertiary structure (Dahlback and Nielsen 2009; Nielsen et al. 2009). ApoM is secreted primarily by the liver and associates with HDL particles through its retained N-terminal signal peptide (Axler et al. 2008; Christoffersen et al. 2008). The silencing of the endogenous apoM gene in mice showed a loss of pre-β-HDL particles and formation of large HDL particles (Wolfrum et al. 2005). In addition to its role in HDL remodeling, it was shown that apoM is the sole carrier of the bioactive lipid sphingosine 1 phosphate (S1P) in HDL, thus mediating many of the atheroprotective properties of HDL in the endothelium (Christoffersen et al. 2011; Arkensteijn et al. 2013; Christoffersen and Nielsen 2013).

The expression of apoM in the liver is primarily controlled by hepatocyte nuclear factor-1α (HNF-1α) (Richter et al. 2003). HNF-1α$^{-/-}$ mice are characterized by the complete absence of apoM from plasma. The plasma concentrations of other apolipoproteins in HNF-1α$^{-/-}$ mice were either similar (apoA-II, apoB, apoC) or increased (apoA-I, apoE) compared to wild-type mice. This was not due to the absence of apoM since restoration of apoM gene expression

in the liver via adenovirus-mediated gene transfer could not rescue the abnormal apolipoprotein profile (Wolfrum et al. 2005). The analysis of the plasma lipoprotein profile of HNF-1α$^{-/-}$ mice showed that similar to the apoM gene-silenced mice, plasma cholesterol was primarily associated with the HDL fraction. In addition, an abnormal large apoE-enriched HDL fraction that was identified as HDLc or HDL1 was observed, suggesting that this abnormal lipid profile in HNF-1α$^{-/-}$ mice may be caused by the lack of apoM (Shih et al. 2001). In humans, HNF-1α regulates apoM gene expression through direct binding to a conserved DNA element located in the proximal apoM promoter region between nucleotides −55 and −41 (Richter et al. 2003).

ApoM gene expression in the liver is negatively regulated during inflammation or infection via pro-inflammatory cytokines such as TNFα or IL-1β (Feingold et al. 2008). The HNF-1α binding element in the proximal human apoM promoter is a dual-specificity regulatory element that mediates the activation or repression of apoM promoter activity by HNF-1 and by activator protein 1 (AP1) proteins (c-Jun and JunB), respectively, in hepatic cells (Mosialou et al. 2011). Competition experiments showed that the binding of Jun proteins and HNF-1α to the apoM promoter is mutually exclusive and chromatin immunoprecipitation assays established that AP1 activation leads to the recruitment of c-Jun and JunB proteins to the proximal apoM promoter with the simultaneous displacement of HNF-1 (Mosialou et al. 2011). A similar mechanism of transcriptional repression via dual-specificity AP1-/HNF-1-responsive elements has been demonstrated in the case of the promoter of the human apolipoprotein A-II gene (Mosialou et al. 2011). AP1 factors were shown to inhibit the promoters of the apolipoprotein C-III (Hadzopoulou-Cladaras et al. 1998) and ABCA1 (Mosialou and Kardassis unpublished) genes in hepatic cells suggesting a broader role of AP1 factors in lipoprotein metabolism in the liver during inflammation.

Besides HNF-1α, apoM gene transcription in the liver has been shown to be controlled positively by liver receptor homologue-1 (LRH-1) and forkhead box A2 (FOXA2) transcription factors which bind to distinct sites on the proximal apoM promoter (Venteclef et al. 2008; Wolfrum et al. 2008). Bile acids suppress apoM expression in vivo by inhibiting LRH-1 transcriptional activity via the recruitment of small heterodimer partner (SHP) to the apoM promoter (Venteclef et al. 2008).

Insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I), and IGF-I potential peptide (IGF-IPP) were all shown to inhibit apoM gene expression in a dose- and time-dependent manner in primary human and murine hepatocytes via a signal transduction pathway that involves the serial activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (PKB) and the inactivation of Foxa2 (Xu et al. 2006). In HepG2 cells, glucose and insulin inhibited apoM gene expression in an additive manner, while in hyperglycemic rats, serum apoM concentrations and hepatic apoM mRNA levels were significantly reduced (Zhang et al. 2007).

The human apoM gene is under the control of various orphan- and ligand-dependent nuclear receptors (Mosialou et al. 2010). The overexpression via adenovirus and silencing via siRNA established that HNF-4 is an important regulator of apoM gene transcription in hepatic cells (Mosialou et al. 2010). In addition to

HNF-4, homodimers of retinoid X receptor and heterodimers of retinoid X receptor with receptors for retinoic acid, thyroid hormone, fibrates (peroxisome proliferator-activated receptor), and oxysterols (liver X receptor) were shown to bind with different affinities to the proximal HRE in vitro and in vivo (Mosialou et al. 2010). These findings provide novel insights into the role of apoM in the regulation of HDL by steroid hormones and into the development of novel HDL-based therapies for diseases such as diabetes, obesity, metabolic syndrome, and coronary artery disease that affect a large proportion of the population in Western countries.

1.7 Transcriptional Regulation of the CETP Gene

The gene encoding the cholesterol ester transfer protein (CETP) plays an important role in human HDL metabolism because it facilitates the transfer of cholesteryl esters from mature spherical HDL particles to VLDL/IDL lipoproteins in exchange of triglycerides and its activity determines the plasma levels of HDL cholesterol (von Eckardstein et al. 2005; Tall et al. 2008).

The CETP gene is expressed mainly in the liver, adipose tissue, and spleen and at lower levels in the small intestine, adrenal, kidneys, and heart (Jiang et al. 1991; Radeau et al. 1995). Atherogenic diets were shown to increase CETP mRNA levels in rabbits and in human CETP transgenic mice (Quinet et al. 1990; Jiang et al. 1992). Both LXRs and SREBPs were shown to bind to regulatory elements on the promoter of the CETP gene and regulate its transcription in response to intracellular cholesterol levels (Gauthier et al. 1999; Luo and Tall 2000). It was shown recently that synthetic LXR agonists enhanced plasma CETP activity and decreased HDL-C levels in cynomolgus monkeys and human CETP transgenic mice (Honzumi et al. 2010). The induction of CETP gene expression by the LXR agonist was significantly reduced by knocking down the expression of LXRα but not LXRβ both ex vivo and in mice (Honzumi et al. 2010). In another study, it was shown that the LXR agonist T0901317 markedly increased CETP mRNA levels and CETP production in human differentiated macrophages but not in human peripheral blood monocytes (Lakomy et al. 2009). In inflammatory mouse and human macrophages, LXR-mediated CETP gene upregulation was inhibited and this inhibition was independent of lipid loading. It was concluded that LXR-mediated induction of human CETP expression is switched on during monocyte-to-macrophage differentiation and is abrogated in inflammatory macrophages (Lakomy et al. 2009).

Other factors that regulate CETP promoter activity include Yin Yang 1 (YY1) that binds to the same element as SREBPs (Gauthier et al. 1999), the LRH-1 that potentiates the sterol-mediated induction of the CETP gene by LXRs (Luo et al. 2001), the orphan nuclear receptor ARP-1 (Gaudet and Ginsburg 1995) that inhibits CETP promoter activity, the retinoic acid receptor (RAR) which regulates CETP gene expression in response to all-*trans*-retinoic acid (Jeoung et al. 1999), and the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) which is an activator of CETP

gene expression (Agellon et al. 1992). Binding sites for the ubiquitous transcription factors SP1 and SP3 have been identified on the CETP promoter at positions −690, −623, and −37 and seem to be essential for the basal CETP promoter activity (Le Goff et al. 2003).

CETP gene expression was shown recently to be under regulation by bile acids and their nuclear receptor farnesoid X receptor (FXR) (Gautier et al. 2013). It was shown that plasma CETP activity and mass was higher in patients with cholestasis than controls and this was associated with lower HDL-C levels (Gautier et al. 2013). In agreement with this observation, bile acid feeding of APOE3*Leiden mice expressing the human CETP transgene controlled by its endogenous promoter decreased HDL-C and increased plasma CETP activity and mass. An FXR response element (FXRE) was identified in the first intron of the human CETP gene which could be responsible for the upregulation of CETP gene expression in response to bile acids (Gautier et al. 2013). In another study, it was shown that FXRα binds to DR4 LXRE that is present in the proximal CETP promoter and represses LXR-mediated transactivation of the CETP promoter by a competition mechanism (Park et al. 2008).

1.8 Transcriptional Regulation of the PLTP Gene

Phospholipid transfer protein (PLTP) belongs to the lipopolysaccharide (LPS) binding/lipid transfer gene family that includes the LPS-binding protein (LBP), the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), and the cholesteryl ester transfer protein (CETP). PLTP is essential in the transfer of very low-density lipoprotein phospholipids into HDL (Jiang et al. 2012).

PLTP is expressed ubiquitously, but the highest expression levels in human tissues were observed in the ovary, thymus, placenta, and lung (Day et al. 1994). Taking into account the organ size involved, the liver and small intestine appear to be important sites for the overall PLTP expression. A high-fat, high-cholesterol diet causes a significant increase in PLTP activity and in mRNA levels. Plasma PLTP activity and PLTP mRNA levels in the liver and adipose tissues were significantly decreased following LPS administration (Jiang and Bruce 1995).

An FXR-responsive element (FXRE) has been found in the proximal PLTP promoter that binds FXRα/RXRα heterodimers and mediates the response of the PLTP promoter to bile acids (Urizar et al. 2000). Fibrates were shown to increase PLTP gene expression by activating PPARs which bind to three PPAR-responsive elements on the PLTP promoter (Tu and Albers 1999; Bouly et al. 2001). Two of these PPAR-responsive elements also seem to be responsible for the induction of PLTP expression by high glucose (Tu and Albers 2001).

The human PLTP promoter contains at least two LXR-responsive elements, one in the proximal and one in the distal region, that were shown to mediate PLTP gene regulation by oxysterols ex vivo and in vivo (Cao et al. 2002; Mak et al. 2002a; Laffitte et al. 2003). It was recently demonstrated that LXR agonists activate triglyceride synthesis and PLTP gene transcription by activating SREBP-1c

(Okazaki et al. 2010). In concert with the increase in triglyceride synthesis, the increased PLTP caused triglyceride incorporation into abnormally large VLDL particles which were removed from plasma by LDL receptors, whereas in the absence of LDL receptors, the large VLDLs accumulated and caused massive hypertriglyceridemia (Okazaki et al. 2010).

Recently, microarray analysis following alteration of p53 status in several human- and mouse-derived cells identified a group of 341 genes whose expression was induced by p53 in the liver-derived cell line HepG2 (Goldstein et al. 2012). Twenty of these genes encode proteins involved in many aspects of lipid homeostasis including PLTP (Goldstein et al. 2012).

1.9 Transcriptional Regulation of the Bile Acid Transporters ABCG5/ABCG8

ATP-binding cassette half-transporters G5 and G8 (ABCG5 and ABCG8) play important roles in the control of sterol excretion from the liver (Fitzgerald et al. 2010; Tarling and Edwards 2012; Li et al. 2013; Yu et al. 2014). Mutations in either of these transporters leads to β-sitosterolemia, an autosomal recessive disease characterized by premature coronary atherosclerosis and elevated levels of phytosterols in plasma (Fitzgerald et al. 2010; Tarling and Edwards 2012; Li et al. 2013; Yu et al. 2014). Mice lacking ABCG5 and ABCG8 proteins have decreased ability to secrete sterols into the bile (Yu et al. 2002a). The overexpression of ABCG5 and ABCG8 in the liver increases biliary cholesterol secretion and decreases dietary cholesterol absorption (Yu et al. 2002b). The human ABCG5 and ABCG8 genes are oriented in a head-to-head configuration, they are transcribed in opposite directions, and their transcription is coordinated by a short 374 bp bidirectional promoter in the intergenic region (Remaley et al. 2002).

The bidirectional promoter of ABCG5/ABCG8 genes contains a binding site for LRH-1 at positions 134–142 which is required for the activity of both the ABCG5 and ABCG8 promoters (Freeman et al. 2004). Mutating this LRH-1 binding site reduced promoter activity of the human ABCG5/ABCG8 intergenic region in HepG2 and Caco2 cells. Bile acids such as deoxycholic acid repressed ABCG5 and ABCG8 promoters via the FXR-SHP-LXR pathway that was described above (Sumi et al. 2007).

Dietary cholesterol feeding was shown to increase duodenal, jejunal, and hepatic expression levels of ABCG5 and ABCG8 mRNA in wild-type mice (Berge et al. 2000). The increase in ABCG5 or ABCG8 gene expression by diet was compromised in mice lacking either LXRα or both LXRα and LXRβ (Repa et al. 2002). Both the RXR-specific agonist LG268 and the LXR-specific agonist T0901317 caused upregulation of ABCG5 and ABCG8 mRNA expression in the liver and intestine of wild-type mice but not in LXRα/β$^{-/-}$ mice (Repa et al. 2002). To identify functional LXREs that control the expression of the ABCG5/ABCG8 genes in response to oxysterols, a recent study searched for evolutionarily conserved regions (ECRs) between the human and the mouse genes and identified

23 ECRs which were studied by luciferase assays for LXR responsiveness (Back et al. 2013). Two ECRs were found to be responsive to the LXR and binding of LXRα to these regions was verified (Back et al. 2013).

The bidirectional promoter of the ABCG5/G8 genes was shown to bind HNF-4 and GATA transcription factors and to be regulated by these factors in a cooperative manner and independent of the orientation of the bidirectional promoter (Sumi et al. 2007).

It was shown that the expression of both ABCG5 and ABCG8 genes is upregulated in the livers of mice with genetic ablation of the insulin receptor gene (LIRKO mice) both at the mRNA and the protein levels (Biddinger et al. 2008). In agreement with these findings, insulin suppressed the expression of ABCG5 and ABCG8 genes at subnanomolar concentrations and in a dose-responsive manner in rat hepatoma cells (Biddinger et al. 2008). The observation that the short intergenic region responded to insulin in both the ABCG5 and ABCG8 orientations suggested the presence of an element in the intragenic region of the ABCG5 and ABCG8 genes that responds to insulin. Using ex vivo and in vivo approaches, it was shown that insulin resistance leads to the activation of the forkhead box 1 (FOXO1) transcription factor which binds to the bidirectional promoter and activates the transcription of both genes severalfold (Biddinger et al. 2008).

1.10 Transcriptional Regulation of the HDL Receptor SR-BI

The gene encoding the HDL receptor scavenger receptor class B type I (SR-BI) is expressed at high levels in the liver and steroidogenic tissues. Several transcription factors have been shown to bind to the human or rodent SR-BI promoter and to regulate SR-BI gene transcription in a positive or negative manner.

The steroidogenic factor-1 (SF-1) has been shown to regulate both the human and rat SR-BI promoters and to serve as mediator of the cAMP-dependent regulation of the SR-BI gene in response to steroidogenic hormones (Lopez et al. 1999).

Liver X receptors α and β and PPARα and γ were shown to bind to distal LXRE and PPARE, respectively, on the human and rat SR-BI promoters and regulate the expression of the human SR-BI gene in response to oxysterols and fibrates (Lopez and McLean 1999; Malerod et al. 2002, 2003), whereas HNF-4 enhances the PPARγ-mediated SR-BI gene transcription (Malerod et al. 2003; Zhang et al. 2011). As discussed above, conditional inactivation of the HNF-4 gene in the liver of adult mice was associated with a significant increase in hepatic SR-BI mRNA levels and a decrease in plasma HDL-C levels, suggesting that HNF-4 influences negatively the expression of the HDL receptor (Hayhurst et al. 2001).

LRH-1 binds to a proximal response element on the human SR-BI promoter in an overlapping manner with SF-1 and activates the SR-BI promoter (Schoonjans et al. 2002). Retrovirus-mediated overexpression of LRH-1 in hepatic cells induced SR-BI gene expression, and this was associated with histone H3 acetylation on the SR-BI promoter. In agreement with these findings, the SR-BI mRNA levels were

decreased in the livers of LRH-1(+/−) animals providing evidence that LRH-1 regulates SR-BI gene expression in vivo (Schoonjans et al. 2002).

Estrogens regulate the activity of the rat SR-BI promoter via estrogen receptors α and β (ERα and β) which bind to three different estrogen response elements (ERE) on the SR-BI promoter (Lopez et al. 2002; Lopez and McLean 2006). In endothelial cells, 17beta-estradiol (E2) increased the mRNA levels of the human SR-BI gene and the activity of the hSR-BI promoter, and this upregulation was protein kinase C (PKC) dependent since it was blocked by the PKC inhibitor bisindolylmaleimide I and a dominant-negative mutant of PKC (Fukata et al. 2013).

The mRNA levels of the mouse SR-BI gene were decreased in mice lacking the FXR nuclear receptor ($FXR^{-/-}$ mice) (Lambert et al. 2003). When WT mice were placed on a diet containing 0.4 % of the FXR agonist cholic acid, the hepatic SR-BI mRNA and protein levels increased in the wild-type but not in the $FXR^{-/-}$ mice, indicating that bile acids positively regulate SR-BI gene expression via FXRs (Lambert et al. 2003). In agreement with these findings, treatment of human hepatoma HepG2 cells with FXR ligands resulted in the upregulation of SR-BI both at the mRNA and protein levels via FXR binding to a novel FXRE, a direct repeat 8 at position −703/−684 of the promoter (Chao et al. 2010). A natural ligand of FXR administered to mice increased hepatic SR-BI expression (Chao et al. 2010). However, in another study, it was reported that bile acids inhibit SR-BI gene expression in the liver of mice and reduce the SR-BI promoter activity (Malerod et al. 2005). It was proposed that this inhibition was due to the FXR-mediated activation of SHP, which repressed the activity of LRH-1 that binds to the proximal SR-BI promoter (Malerod et al. 2005).

The zinc finger transcription factor Kruppel-like factor 4 (KLF4) was shown to bind to a putative KLF4 element on the SR-BI promoter at position −342/−329 and upregulate its activity in peripheral blood mononuclear cells and PMA-differentiated THP-1 cells treated with HDL (Yang et al. 2010).

Using high-throughput screening of 6,000 microbial secondary metabolite crude extracts for the identification of compounds that upregulate the SR-BI promoter in HepG2 cells, several putative SR-BI upregulators were identified: hoxyl-3′,5,7-hydroxyl isoflavone; (9R,13S)-7-deoxy-13-dihydrodaunomycinone; pratensein; the isoflavones formononetin, genistein, and daidzein; and the histone deacetylase inhibitor trichostatin A (Yang et al. 2007, 2009; Bao et al. 2009). Some of these compounds were shown to increase the uptake of DiI-labeled HDL and the efflux of cholesterol to HDL by cells.

In steroidogenic tissues, SR-BI supplies the cells with exogenous cholesterol for storage or for the synthesis of steroid hormones. In these tissues, SR-BI expression was shown to be upregulated by adrenocorticotropic hormone (ACTH) (Sun et al. 1999). The suppression of ACTH by the synthetic corticosteroid dexamethasone (which inhibits the hypothalamic-pituitary axis and decreases ACTH secretion) decreased SR-BI levels. However, the mechanism by which ACTH and glucocorticoid regulate the expression of the SR-BI gene in steroidogenic tissues is unclear. It was shown that the transcription of the human SR-BI gene is subject to feedback inhibition by glucocorticoids in adrenal and ovarian cells. SR-BI mRNA

levels were increased in adrenals from corticosterone-insufficient $Crh^{-/-}$ mice, whereas corticosterone replacement by oral administration inhibited SR-BI gene expression in these mice (Mavridou et al. 2010). The glucocorticoid-mediated inhibition of SR-BI gene transcription required de novo protein synthesis and the glucocorticoid receptor (GR). No direct binding of GR to the SR-BI promoter could be demonstrated in vitro and in vivo, suggesting an indirect mechanism of repression of SR-BI gene transcription by GR in adrenal cells (Mavridou et al. 2010).

In the rat ovary, the uptake of cholesterol by the theca-interstitial cells is mediated by SR-BI. It was shown that insulin and the trophic hormone LH/cGH stimulate the expression of SR-BI in theca-interstitial cells and increase intracellular cholesterol, which is subsequently mobilized for androgen biosynthesis (Li et al. 2001; Towns et al. 2005).

In the adrenocortical cell line Y-1, adenovirus-mediated overexpression of prolactin regulatory element-binding (PREB) protein, a transcription factor that regulates prolactin expression in the anterior pituitary and is induced by cAMP, increased the levels of SR-BI protein and the activity of the SR-BI promoter by binding to a PREB-responsive *cis*-element of the SR-BI promoter. Using small interfering RNA against PREB in Y-1 cells, the effects of cAMP on SR-BI expression were attenuated. It was concluded that in the adrenal gland under conditions of cAMP increase, PREB regulates the transcription of the SR-BI gene (Murao et al. 2008).

Intracellular sterol levels regulate SR-BI gene expression via SREBP-1a which binds to two sterol-responsive elements (SREs) present on the rat SR-BI promoter (Cao et al. 1997; Lopez and McLean 1999). The ubiquitous transcription factors SP1 and SP3 bind to several GC-rich boxes present on the proximal SR-BI promoter and have been shown to be important for the basal activity as well as the SREBP-1a-mediated transactivation of the SR-BI promoter (Shea-Eaton et al. 2001).

The expression of the SR-BI gene is also subject to negative regulation by transcription factors including the orphan nuclear receptor dorsal-sensitive sex adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome gene 1 (DAX-1), which was shown to repress the rat SR-BI promoter by interfering with the SF-1- and SREBP-1a-mediated transactivation of the this promoter (Lopez et al. 2001). In addition, YY1 transcription factor binds directly to two sites on the SR-BI promoter and downregulates its activity by interfering with the binding of SREBP-1a to the SR-BI promoter (Shea-Eaton et al. 2001).

2 Posttranscriptional Regulation of HDL Genes by Noncoding RNAs and microRNAs

According to the Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE project), 76 % of the human genome is transcribed (Bernstein et al. 2012; Djebali et al. 2012). While novel promoter and enhancer regions have been described (Bernstein et al. 2012; Sanyal et al. 2012), some of the newly described genes encode for noncoding RNAs

including microRNAs (miRNAs), small interfering RNAs (siRNAs), piwi-interacting RNAs (piRNAs), circular RNAs (circRNAs), long noncoding RNAs (lncRNAs), *trans*-acting siRNAs (tasiRNAs), and several other noncoding RNAs. Their abundance and their recognized roles in transcriptional and epigenetic gene regulation and their involvement in several diseases suggest the existence of an extensive regulatory network on the basis of RNA signaling (Mattick and Makunin 2005). An important class of these endogenous noncoding RNAs is miRNAs. miRNAs are small noncoding RNAs (~22 nt) that have emerged as important posttranscriptional regulators of different protein-coding genes (Bartel 2009) including those related to HDL metabolism (Davalos and Fernandez-Hernando 2013).

2.1 miRNAs: Biogenesis and Function

Although originally described as regulators of developmental timing in *Caenorhabditis elegans* (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993), miRNAs did not receive special attention until their widespread identification in different species (Lagos-Quintana et al. 2002; Reinhart et al. 2002) and their role in human diseases was uncovered (Calin et al. 2002). miRNAs are important posttranscriptional regulators of gene expression through sequence-specific complementary binding to the 3′ untranslated region (UTR) of the target mRNA (Bartel 2009), even though certain miRNAs can interact with other target mRNA regions including the 5′ UTR, coding region, or intron–exon junction and even increase rather than decrease target mRNA expression (Vasudevan et al. 2007; Orom et al. 2008; Tay et al. 2008; Schnall-Levin et al. 2010). The interaction of a miRNA with its target mRNA results in the inhibition of translation and/or degradation of mRNAs (Guo et al. 2010; Krol et al. 2010).

miRNA biogenesis and function have been intensively studied in recent years (Bartel 2009; Krol et al. 2010). Briefly, in most mammals, these small RNAs are transcribed by RNA polymerase II into a primary long miRNA (pri-miRNA). The pri-miRNA is then processed in the nucleus into an ~70 nucleotide precursor hairpin (pre-miRNA) by a multiprotein complex containing different cofactors and two core components, a ribonuclease III (Drosha) and a double-stranded RNA-binding domain protein (DGCR8/Pasha). Some intronic miRNAs that bypass Drosha-mediated processing are produced by splicing and debranching (miRtrons). Pre-miRNAs are transported to the cytoplasm by Exportin 5 in a Ran-GTP-dependent manner (Lund et al. 2004) where they are further cleaved by an RNAse III enzyme called Dicer, generating the mature ~22 nt long miRNA/miRNA* duplex. Dicer-independent miRNA biogenesis has also been described (Cifuentes et al. 2010). The duplex miRNA is separated and one of the strands associates with an argonaute protein (Ago) within the RNA-induced silencing complex (RISC), guiding the complex to the complementary sites within the 3′ UTR of the target mRNA to induce mRNA repression and/or degradation. Although the miRNA/miRNA* duplex is initially produced in equal amounts, the miRNA*

strand (passenger strand) is usually degraded. However, it also contains target recognition sites and is thus functional (Yang et al. 2011). Argonaute proteins are major players in miRNA-mediated gene regulation (Meister 2013). Although several aspects of miRNA biogenesis and function are well characterized, the different factors that regulate their decay or turnover are not well known (Krol et al. 2010).

Sequencing studies have identified ~2,000 miRNAs encoded in our human genome, and prediction algorithms suggest that 60 % of human protein-coding genes have conserved targets for pairing with miRNAs within their 3′ UTR (Friedman et al. 2009). Factors that influence miRNA target selection include the "seed" sequence which consists of nucleotides 2–8 at the 5′ end of the mature miRNA (Bartel 2009) and tissue distribution or developmental stage, as certain miRNAs are highly expressed or even restricted to certain cell types and can only target their mRNA target if they are co-expressed in the same tissue at the same time (Lagos-Quintana et al. 2002; Small and Olson 2011). In contrast to most plant miRNAs, which bind with near perfect complementarity to their targets, most mammalian miRNAs bind with mismatches and bulges and the mode of binding determines the type of posttranscriptional repression (Carthew and Sontheimer 2009). Recent experimental data suggest that around 60 % of seed interactions are noncanonical, containing bulged or mismatched nucleotides which are accompanied by specific, non-seed base pairing (Helwak et al. 2013). Some miRNA-mRNA interactions also involve the 3′ end of the miRNA (Helwak et al. 2013). Moreover, pseudogenes (Poliseno et al. 2010), long noncoding RNAs (lncRNAs) (Cesana et al. 2011), and circular RNAs (Hansen et al. 2013) that contain miRNA binding sites also influence miRNA activity, acting as competing endogenous RNAs (ceRNAs) and thus sequestering miRNAs and preventing them from binding to their mRNA targets (Salmena et al. 2011).

While the primary role of miRNAs seems to be the "fine-tuning" of gene expression, their capacity to simultaneously bind and repress multiple target genes and similarly the possibility of a single mRNA to be targeted by multiple miRNAs provide a mechanism to synchronize the coordinated regulation of a large number of transcripts that govern an entire biological process, thus resulting in strong phenotypic output (Mendell and Olson 2012). The high redundancy among related and non-related miRNAs in regulating gene expression reduces the importance of a particular miRNA under conditions of normal cellular homeostasis. However, compelling evidence suggests that under conditions of stress the function of miRNAs become especially pronounced (Mendell and Olson 2012) and their pharmacological modulation represents a novel approach to treat disease by modulating entire biological pathways as described in Davalos and Chroni (2014).

Compelling evidences have shown that miRNAs are present in the systemic circulation and other human biological fluids associate with extracellular microvesicles, exosomes (Valadi et al. 2007; Hunter et al. 2008), Ago2 complex (Arroyo et al. 2011), or HDL (Vickers et al. 2011). Even exogenous miRNAs have been described in our circulating plasma (Wang et al. 2012b; Zhang et al. 2012). Although several circulating miRNAs have been implicated as disease biomarkers

in several diseases (Allegra et al. 2012; Kinet et al. 2013) or secreted for intercellular communication (Chen et al. 2012b), the biological significance, the factors that modulate their extracellular secretion, and the mechanisms by which they reach the target tissue still remain elusive. HDL has been shown to transport and deliver endogenous miRNAs to recipient cells with functional targeting capabilities (Vickers et al. 2011). Although the HDL miRNA signature from normal subjects was found to be different from hypercholesterolemic subjects (Vickers et al. 2011), the extent by which HDL-bound miRNAs contribute to total circulating miRNAs and thus regulate target cell gene function is not clear (Wagner et al. 2013).

In summary, miRNAs play a major role in almost every aspect of cellular function by posttranscriptional regulation of gene expression. Whether other noncoding RNAs (that modulate miRNA activity) or circulating or extracellular miRNAs might modulate HDL metabolism is not known. However, it seems obvious that by modulating miRNA activity, they might also have a role in HDL metabolism.

2.2 Posttranscriptional Modulation of HDL Metabolism by miRNAs

For normal function, mammalian cells must maintain cellular cholesterol levels within tight limits. Thus, complex mechanisms have been evolutionarily developed to control both cellular input from endogenous cholesterol biosynthesis or the uptake from circulating lipoproteins and cellular output by controlling cholesterol efflux. miRNAs have emerged as important regulators of HDL and cholesterol metabolism, and their functions are summarized in Fig. 5 and described in detail below. Although miRNAs have increased the complexity of HDL metabolism regulation, our understanding of every single step in their regulation will provide better opportunities to develop novel targets for their therapeutic modulation.

2.2.1 Targeting ABCA1 and ABCG1

ABCA1 is one of the most important proteins directly involved in the elimination of excess cholesterol from cells (cholesterol efflux). As described in this chapter, ABCA1 is regulated at the transcriptional, posttranscriptional, and posttranslational level. Its regulation is in accordance with the cellular need to handle cholesterol levels within tight limits, as excess of free cholesterol is deleterious to cells. ABCA1 mRNA contains a particularly long 3′ UTR (>3.3 kb) as compared to other common genes involved in cholesterol and HDL metabolism including LCAT (20 bp), apoA-I (55 bp), ApoA-II (112 bp), CETP (178 bp), apoB (301 bp), PDZK1 (583 bp), ABCG1 (852 bp), SR-BI (959 bp), PCSK9 (1,269 bp), IDOL (1,496 bp), CAV-1 (1,898 bp), LIPG (2,386 bp), and LDLR (2,513 bp) (Davalos and Fernandez-Hernando 2013). This unusually long 3′ UTR of ABCA1 clearly raises the probability of posttranscriptional regulation by miRNAs (and probably other noncoding RNAs). Different prediction algorithms indicate that ABCA1 can potentially be targeted by ~100 miRs. Some of them have been experimentally validated

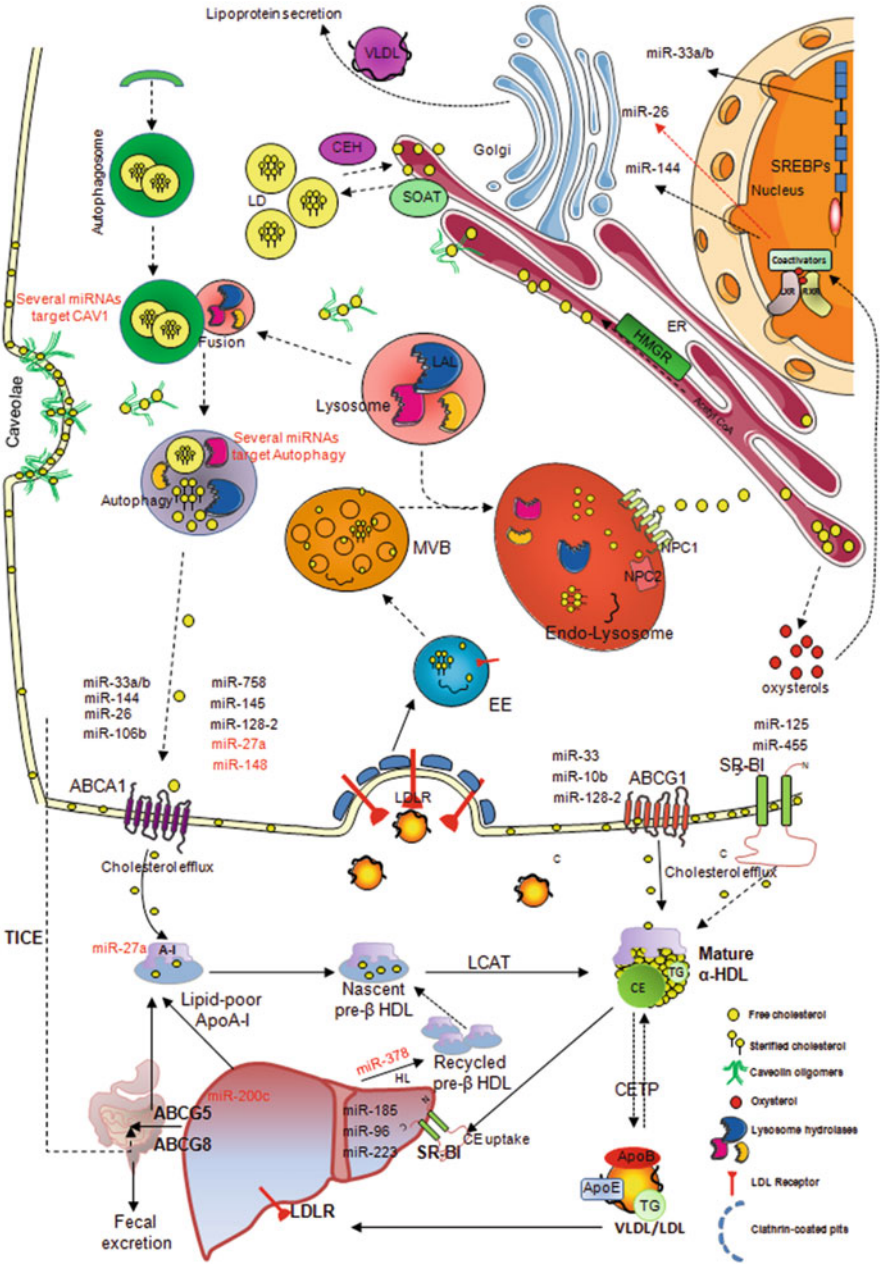


Fig. 5 Overview of posttranscriptional regulation by miRNAs of proteins involved in cholesterol efflux, RCT, and HDL metabolism. HDL metabolism and the role of individual proteins such as plasma enzymes, membrane transporters, and receptors are described in the text and more extensively in other chapters. Autophagy, the cell catabolism process through the lysosomal machinery, has been proposed to participate in cholesterol efflux. The induction of SREBPs induces the expression of miR-33 family. The induction of LXR induces the expression of miR-144 and represses miR-26. The induction of FXR also induces miR-144. miRNAs in black

for their importance in cholesterol efflux, reverse cholesterol transport, and cardiovascular disease, whereas other miRNAs still remain to be elucidated. Validated miRNAs that directly target ABCA1 are miR-33 family, miR-758, miR-106b, miR-26, miR-144, miR-10b, miR-128-2, and miR-145 (Fig. 5).

miR-33a and miR-33b play a crucial role in controlling cholesterol efflux and HDL function in concert with their host genes, the SREBP transcription factors (Najafi-Shoushtari et al. 2010; Horton et al. 2002; Horie et al. 2010; Marquart et al. 2010; Rayner et al. 2010). While both mature miRNAs only differ in two nucleotides, they are predicted to have largely overlapping sets of target genes in rodents (Rayner et al. 2011b; Horie et al. 2012) and nonhuman primates (Rayner et al. 2011a; Rottiers et al. 2013). The inhibition of the two miR-33 isoforms, either genetically or therapeutically, resulted in increased cholesterol efflux, increased HDL levels, increased reverse cholesterol transport, reduced atherosclerosis, and reduced VLDL triglyceride levels. Although miR-33a and miR-33b target different genes involved in lipid homeostasis, fatty acid β-oxidation, insulin signaling, and biliary transporters (Gerin et al. 2010; Davalos et al. 2011; Rayner et al. 2011a; Allen et al. 2012; Horie et al. 2013), their effects are mediated mainly by ABCA1. The human 3′ UTR of ABCA1 has three functional binding sites for miR-33. While most of the studies have been performed in tissues/cells directly related to lipoprotein metabolism and CVD (i.e., hepatocytes, macrophages), it is possible that from these ~100 miRs that potentially target ABCA1 3′ UTR, some of them might be relevant to other cells and tissues as well.

Regarding other tissues, miR-106b (Kim et al. 2012) and miR-758 (Ramirez et al. 2011) were found to regulate neuronal cholesterol excess. While miR-758 expression is particularly high in the brain and its expression is mediated by high cholesterol levels, the expression of miR-106 in brain tissues is low. However, their role in neuronal cholesterol efflux suggests that these miRNAs may contribute to the regulation of cholesterol levels in the brain. miR-758 and miR-106 directly target the 3′ UTR of ABCA1 by binding to two sites and one site, respectively. Moreover, miR-758 has other targets involved in neurological functions (Ramirez et al. 2011). miR-106b also targets the amyloid precursor protein (APP) and increases the amyloid β (Aβ) peptide secretion and clearance (Kim et al. 2012).

HDL metabolism is regulated by the LXRs which control the transcription of several genes related to lipid metabolism in response to hydroxylated products of cholesterol as described above (Calkin and Tontonoz 2012). Recent data suggest that LXRs also regulate HDL metabolism posttranscriptionally (Sun et al. 2012; de Aguiar Vallim et al. 2013; Ramirez et al. 2013; Vickers and Rader 2013). The induction of LXR resulted in the repression of miR-26 and induction of miR-26-a-1,

Fig. 5 (continued) labels are validated miRNAs for HDL metabolism. miRNAs in red labels are suggested miRNAs, but not fully validated, in HDL metabolism. All biological processes may not necessarily happen in the same cell type. Abbreviations: endoplasmic reticulum (ER); early endosome (EE); cholesterol ester hydrolase (CEH); multivesicular bodies (MVB); lysosomal acid lipase (LAL) (Figure courtesy of Dr. Alberto Canfrán-Duque)

and miR-144 that directly target the 3′ UTR of ABCA1 and thus regulate cholesterol efflux, RCT, and HDL levels. While having one binding site for miR-26-a-1 (Sun et al. 2012), the human 3′ UTR of ABCA1 has several (up to seven) predicted binding sites for miR-144 (Ramirez et al. 2013). miR-26-a-1 also targets the ADP-ribosylation factor-like 7 (Arl7), which participates in cellular cholesterol efflux (Engel et al. 2004). miR-144 expression is also induced by the nuclear receptor FXR (Vickers and Rader 2013). By controlling bile acid levels, FXR activation will not only repress the expression of ABCA1 posttranscriptionally but will also induce the expression of SR-BI, thereby resulting in an increased uptake of plasma HDL cholesterol and increased cholesterol biliary excretion via ABCG5/ABCG8 (de Aguiar Vallim et al. 2013).

Evolutionarily, the dual effect of LXR activation on miR-144 induction and mR-26-a-1 repression seems obvious, as cells must maintain cellular cholesterol levels within tight limits and these miRNAs might work as buffers against deleterious variation in gene expression programs.

Other miRNAs including miR-10b, miR-128-2, and miR-145 also regulate cellular cholesterol efflux by directly targeting the 3′ UTR of ABCA1. Protocatechuic acid, an intestinal microbiota metabolite of cyanidin-3-O-glucoside, was found to repress miR-10b and thus regulate cholesterol efflux (Wang et al. 2012a). While in hepatocytes the inhibition of miR145 increases cholesterol efflux, in pancreatic islet beta cells it improves glucose-stimulated insulin secretion (Kang et al. 2013). The proapoptotic miRNA miR-128-2 was also found to regulate cholesterol efflux by targeting (one binding site) the 3′ UTR of ABCA1 (Adlakha et al. 2013). Recent data suggest that this miRNA family governs neuronal excitability and motor behavior in mice (Tan et al. 2013) and that miR-128-2 might control neuronal cholesterol levels. RXRα is also a direct target of miR-128-2 (Adlakha et al. 2013). miR-27a and miR-148 were found to repress an ABCA1 3′ UTR luciferase reporter construct; however, their physiological role in regulating cholesterol efflux has not been described (Kang et al. 2013).

ABCG1, the other member of the ATP-binding cassette transporter family, which also participates in cellular cholesterol efflux to HDL, was found to be directly regulated by some of these miRNAs. miR-33, miR-10b, and miR-128-2 regulate cholesterol efflux by posttranscriptionally regulating ABCG1 through binding to its 3′ UTR (Rayner et al. 2010; Wang et al. 2012a; Adlakha et al. 2013).

2.2.2 Targeting SR-BI

Liver regulation of SR-BI is primarily achieved posttranslationally through a PDZ domain-containing adaptor protein (PDZK1) (Kocher et al. 2003; Kocher and Krieger 2009) as described in detail in a later section of this chapter. Increasing evidence suggests that other posttranscriptional mechanisms, such as targeting by miRNAs, also regulate SR-BI protein levels. Prediction miRNA analysis (www.targetscan.org) suggests that ~25 miRNA families might target SR-BI, most of which are poorly conserved among mammals and vertebrates. miR-125a and miR-455 were found to repress the lipoprotein-supported steroidogenesis by directly targeting the 3′ UTR of SR-BI (Hu et al. 2012). In hepatic cells, where

SR-BI is expressed at higher levels, the expression of miR-125a was also high and its overexpression resulted in a reduced SR-BI-mediated selective cholesterol ester uptake. In contrast, miR-455 did not show any effect on hepatic SR-BI expression (Hu et al. 2012). miR-185, miR-96, and miR-223 were also found to directly target the 3′ UTR of SR-BI and to repress HDL cholesterol uptake in hepatic cells (Wang et al. 2013a).

2.2.3 Targeting Other miRNAs Related to HDL Biogenesis and Function

miR-27a was suggested to regulate apoA-I plasma levels, but the direct interaction to its 3′ UTR was not evaluated (Shirasaki et al. 2013). Several other miRNAs were proposed to regulate genes involved in cholesterol efflux, RCT, or HDL metabolism, including ABCG5 (Liu et al. 2012) or endothelial lipase (Kulyte et al. 2013), but either their direct interaction with the 3′ UTR of these genes or their physiological effects on HDL metabolism were not directly assessed.

Autophagy is the catabolic process by which unnecessary or dysfunctional cellular components are degraded in the lysosome. During starvation, this breakdown of cellular components contributes to the maintenance of cellular energy levels. The hydrolysis of cytoplasmic cholesteryl ester of lipid droplets is normally mediated by the action of neutral cholesteryl ester hydrolases. It has been recently recognized that lipid droplets can also be delivered to lysosomes via autophagy, where lysosomal acid lipase can hydrolyze lipid droplet cholesteryl esters to generate free cholesterol for cholesterol efflux (Ouimet et al. 2011).

Several miRNAs have been described that regulate different targets in autophagy (Frankel and Lund 2012). miRNAs that target key pathways in lipid-loaded macrophage autophagy genes and/or cholesterol ester hydrolases might be promising targets to promote cholesterol efflux (Davalos and Fernandez-Hernando 2013). Caveolin, the major protein coat of caveolae, has been proposed to contribute to cellular cholesterol efflux (Truong et al. 2010; Kuo et al. 2011). There is accumulating evidence that several miRNAs including miR-103, miR-107, miR-133a, miR-192, miR-802, and others target caveolin (Nohata et al. 2011; Trajkovski et al. 2011) but their contribution to cholesterol efflux, RCT, and HDL metabolism and their real physiological contribution to HDL function remain to be elucidated.

3 Posttranslational Mechanisms of HDL Regulation

3.1 ABCA1

In addition to the transcriptional and posttranscriptional mechanisms described above, the expression of ABCA1 is also regulated at the posttranslational level. Following its synthesis, ABCA1 is inserted into the ER where it undergoes proper folding, N-glycosylation, dimerization, and disulfide bond formation and transport to the plasma membrane via the ER-Golgi system (Fig. 6) (Kang et al. 2010).

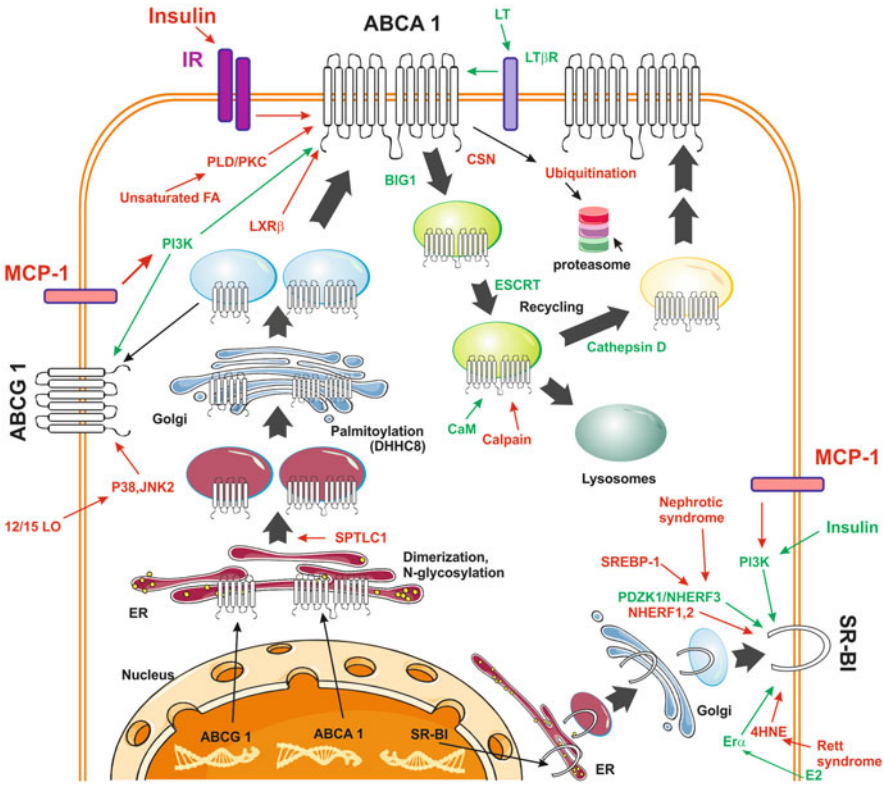


Fig. 6 Overview of the mechanisms that regulate the expression of ABCA1, ABCG1, and SR-BI genes at the posttranslational level. The mechanisms are described in the text. Abbreviations: endoplasmic reticulum (ER); Asp-His-His-Cys 8 (DHHC8); serine palmitoyltransferase 1 (SPTLC1); guanine nucleotide-exchange protein 1 (BIG1); endosomal sorting complex required for transport (ESCRT); Pro-GLu-Ser-Thr (PEST); calmodulin (Cam); lymphotoxin (LT); LT-β receptor (LTβR); phospholipase D (PLD); protein kinase C δ (PKCδ); insulin receptor (IR); phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K); 12/15-lipoxygenase (12/15LO); PDZ-containing kidney protein 1 (PDZK1); Na^+/H^+ exchanger regulator factor-3 (NHERF3); 4-hydroxy-2-nonenal (4HNE); monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)

Transport from the ER to the Golgi is prevented when ABCA1 interacts with the enzyme serine palmitoyltransferase 1 (SPTLC1) which participates in the biosynthetic pathway of sphingomyelin, a major phospholipid component of membranes. The ABCA1/SCPTL1 interaction may regulate the levels of intracellular pools of sphingolipids when the cellular demands for these lipids are high. Pharmacological inhibition of SPTLC1 with myriocin, an atypical amino acid and antibiotic derived from thermophilic fungi (Miyake et al. 1995), increases both the ABCA1 levels at the plasma membrane and the ABCA1-mediated cholesterol efflux (Tamehiro et al. 2008). Mutations in ABCA1 that prevent normal glycosylation cause failure

of ABCA1 to exit the ER (Singaraja et al. 2006). In the Golgi compartment, ABCA1 undergoes palmitoylation at cysteine residues 3, 23, 1110, and 1111 by the palmitoyltransferase Asp-His-His-Cys 8 (DHHC8) (Singaraja et al. 2009). Inhibiting this enzyme by drugs or preventing ABCA1 palmitoylation by site-specific mutagenesis reduced ABCA1 levels at the plasma membrane and decreased efflux to apoA-I (Singaraja et al. 2009). The gene encoding cathepsin D, a lysosomal protease, was identified by comparative transcriptomic analysis to be associated with low HDL-C levels in humans (Haidar et al. 2006). Blocking the activity or expression of cathepsin D reduced ABCA1 expression and protein abundance as well as apoA-I-mediated lipid efflux by more than 70 % and caused retention of ABCA1 in lysosomal compartments (Haidar et al. 2006). Very recently, BIG1 (brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1) was found to modulate ABCA1 trafficking and functions in the liver cells (Lin et al. 2013). BIG1 depletion reduced surface ABCA1 on HepG2 cells and inhibited by 60 % cholesterol efflux, whereas BIG1 overexpression had the opposite effects. RNA interference with BIG1 dramatically decreased the internalization and recycling of ABCA1. This novel function of BIG1 was dependent on the guanine nucleotide-exchange activity and achieved through the activation of ADP-ribosylation factor 1 (Lin et al. 2013).

The transport of ABCA1 to the plasma membrane is also facilitated by certain members of the family of small GTPase including Rab8, Rab4A, and Rab4B (Linder et al. 2009) (Jean and Kiger 2012).

Calpain, a cysteine protease, cleaves ABCA1 at the PEST (proline, glutamic acid, serine, threonine) sequence (amino acids 1283–1306) that is located in the cytosolic loop of the molecule, and this cleavage takes place at the early endosomes (Fig. 6) (Yokoyama et al. 2012; Miyazaki et al. 2013). The deletion of the PEST sequence increases ABCA1 levels on the plasma membrane and apoA-I binding (Chen et al. 2005). The interaction with apoA-I stabilizes ABCA1 against this degradation (Arakawa and Yokoyama 2002; Wang et al. 2003; Arakawa et al. 2004). Importantly, the inhibition of calpain was shown to increase HDL biogenesis in cultured cells, indicating that the inhibition of proteolytic degradation of ABCA1 could be a promising strategy for increasing HDL (Lu et al. 2008). The phosphorylation of the PEST sequence of ABCA1 at Thr-1286 and Thr-1305 regulates calpain-mediated proteolysis of ABCA1 since the ABCA1-T1286A/T1305A mutant could not be degraded by calpain (Martinez et al. 2003). The interaction of ABCA1 with apoA-I results in the dephosphorylation of the ABCA1 PEST sequence and inhibition of calpain degradation, leading to an increase of ABCA1 cell-surface expression (Martinez et al. 2003). Calmodulin was also shown to interact with ABCA1 in the presence of Ca^{2+} and to protect from calpain-mediated degradation (Iwamoto et al. 2010).

In addition to the calpain-mediated proteolytic degradation of ABCA1 described above, ABCA1 is subject to ubiquitin-mediated proteolysis. The presence of ubiquitinated ABCA1 in the plasma membrane of several cell lines was recently demonstrated (Mizuno et al. 2011). In HuH-7 cells, the degradation of cell-surface-resident ABCA1 was inhibited by the overexpression of a dominant-negative form

of ubiquitin. Moreover, the disruption of the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) pathway by the knockdown of hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS) delayed the degradation of ABCA1 (Mizuno et al. 2011). These findings suggested that ubiquitination mediates the lysosomal degradation of plasma membrane ABCA1 and thereby regulates the expression and cholesterol efflux functions of ABCA1 independently of the calpain-mediated pathway.

Unsaturated fatty acids such as oleate and linoleate were shown to destabilize ABCA1 protein and to inhibit ABCA1-mediated cholesterol efflux in macrophages by a mechanism that depends on the activity of the enzyme acyl-CoA synthetase 1 which is responsible for their activation to their CoA derivatives (Kanter et al. 2012). At the same time, unsaturated fatty acids increase the Ser phosphorylation of ABCA1 via a phospholipase D (PLD)/protein kinase C δ pathway which contributes to ABCA1 destabilization (Fig. 6) (Wang and Oram 2007).

Two additional proteins that were identified by two-hybrid screen to physically interact with ABCA1 and to regulate ABCA1 intracellular localization and turnover by interacting with its PDZ (PSD-95, Dlg, ZO-1) domain are the a1 and b1 syntrophins (Munehira et al. 2004). Given the short half-life of ABCA1 ($t_{1/2}$ = 1–2 h) (Wang et al. 2003), interfering with the accessory proteins or the enzymes that posttranslationally modify ABCA1 may prove a valuable strategy to regulate ABCA1-mediated HDL biogenesis in the liver and the intestine or to enhance cholesterol efflux in peripheral cells.

Insulin enhances ABCA1 protein degradation in HepG2 cells via PI3K. In addition, it inhibits ABCA1 activity by phosphorylation at Tyr1206 (Nonomura et al. 2011). The kinase that is responsible for this Tyr phosphorylation of ABCA1 is not known, but it was hypothesized that it is the insulin receptor itself.

TNFα and lymphotoxin α (LT) are key inflammatory mediators which also contribute to the atherogenic process (Schreyer et al. 1996, 2002; Pamir et al. 2012). TNF induces ABCA1 mRNA and protein levels as well as cholesterol efflux from cultured macrophages to apoA-I (Gerbod-Giannone et al. 2006). The induction of ABCA1 by TNFα depended primarily on NF-κB (Gerbod-Giannone et al. 2006). It was also shown that the expression of the two TNF receptors is required to mediate full ABCA1 induction by TNFα. In addition, LT increased ABCA1 protein levels by inhibiting protein degradation through the LT-β receptor (LTβR) (Edgel et al. 2010).

ABCA1-mediated cholesterol efflux and ABCA1 protein levels were shown to be decreased by interferon γ (IFNγ) in murine macrophages and macrophage-derived foam cells (Panousis and Zuckerman 2000). This ABCA1 downregulation was an early event in IFNγ-mediated activation of macrophages (Alfaro Leon et al. 2005) and was dependent on signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) since similar effects were not observed in macrophages from STAT1 KO mice (Wang et al. 2002).

Additional protein kinases were shown to affect the activity and stability of ABCA1 at the posttranslational level including protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), Janus kinase 2 (JAK2), and casein kinase (CK2) (Tang et al. 2004).

ABCA1 activity was shown to be regulated by the nuclear receptor LXRβ by a mechanism that is distinct from the transcriptional induction of the ABCA1 gene caused by cholesterol accumulation. It was shown that at low cholesterol levels, LXRβ binds to ABCA1 and the ABCA1-LXRβ complex is stably localized at the plasma membrane but is unable to facilitate apoA-I-mediated cholesterol efflux. Exogenously added LXR ligands, which mimic cholesterol accumulation, cause LXRβ to dissociate from ABCA1, thus freeing ABCA1 for apoA-I binding and subsequent cholesterol efflux (Hozoji et al. 2008; Hozoji-Inada et al. 2011).

3.2 ABCG1

Similar to ABCA1, the levels of ABCG1 transporter were shown to be subject to regulation at the posttranslational level (Fig. 6) (Tarling and Edwards 2012). Recent studies showed that the presence of additional 12 amino acids between the Walker B motif and the first transmembrane domain of ABCG1 can affect ABCG1 protein stability (Engel et al. 2006). It was shown that stable overexpression of 12/15-lipoxygenase (12/15LO) in macrophages was associated with a 30 % reduction in HDL-mediated cholesterol efflux and reduced ABCG1 protein expression (Nagelin et al. 2008). Treatment of macrophages with the 12/15LO eicosanoid product 12SHETE increased serine phosphorylation of ABCG1 and affected the stability of the protein (Nagelin et al. 2008). Proteasomal inhibitors blocked the downregulation of ABCG1 and resulted in the accumulation of phosphorylated ABCG1 (Nagelin et al. 2009). Macrophages that lack 12/15LO had enhanced ABCG1 expression, reduced ABCG1 phosphorylation, and increased cholesterol efflux. Conversely, macrophages that overexpress 12/15LO have reduced ABCG1 expression, increased transporter phosphorylation, and reduced cholesterol efflux (Nagelin et al. 2009). It was also shown that 12/15LO regulates ABCG1 expression and function through p38- and JNK2-dependent mechanisms (Nagelin et al. 2009).

The activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in human aortic endothelial cells resulted in increased levels of ABCG1 protein via a posttranscriptional mechanism that involved increased stability of ABCG1 mRNA (Li et al. 2010a, b). The aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR)-dependent induction of ABCG1 was associated with increased efflux of cellular cholesterol and 7-ketocholesterol to HDL and protected nitric oxide synthase activity and vascular reactivity (Li et al. 2010a, b).

The protein levels of ABCG1 were shown to be controlled by palmitoylation in both human embryonic kidney 293 cells and in mouse macrophage, J774 (Gu et al. 2013). Five cysteine residues located at positions 26, 150, 311, 390, and 402 in the NH2-terminal cytoplasmic region of ABCG1 were shown to be palmitoylated. The removal of palmitoylation at Cys311 by mutating the residue to Ala (C311A) or Ser significantly decreased ABCG1-mediated cholesterol efflux. On the other hand, the removal of palmitoylation at sites 26, 150, 390, and 402 had no significant effect (Gu et al. 2013).

3.3 SR-BI

The stability of the HDL receptor SR-BI in the hepatocyte plasma membrane is very important for its functions and is subject to posttranscriptional regulation (Fig. 6). SR-BI stability is primarily controlled by its adapter protein, PDZ-containing kidney protein 1 (PDZK1 or NHERF3 for Na^+/H^+ exchanger regulator factor-3), since PZK1-knockout mice exhibit a >95 % reduction in hepatic SR-BI protein (but not mRNA) and are characterized by hypercholesterolemia and the presence of large cholesterol-rich HDL particles in the plasma (Kocher et al. 2003). In adrenal cells where the PDZK1 levels are very low, additional members of the NHERF family such as NHERF1 and NHERF2 (but not NHERF4) were shown to specifically interact with SR-BI and reduce its protein levels (Hu et al. 2013). The data showed that the downregulation of SR-BI by these NHERF1/2 factors significantly inhibits both HDL-CE uptake and steroid hormone production by adrenal cells. It was concluded that the PDZK1 homologues act as physiological translational/posttranslational regulators of the functional expression of SR-BI (Hu et al. 2013).

Feeding mice with an atherogenic diet was accompanied by a threefold post-translational downregulation of hepatic SR-BI at the protein level (Niemeier et al. 2009). A similar SR-BI downregulation was observed in transgenic mice overexpressing SREBP-1a and SREBP-1c on chow diet, and it was associated with a decrease in the expression levels of PDZK1 (Niemeier et al. 2009).

The levels of SR-BI protein were shown to be affected in two syndromes: the nephrotic syndrome and the Rett syndrome. It was shown that animals with nephrotic syndrome which is characterized by dyslipidemia, impaired high-density lipoprotein (HDL)-mediated reverse cholesterol transport, and atherosclerosis (Vaziri et al. 2003) exhibited severe hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, reduced HDL/total cholesterol ratio, significant upregulation of the endocytic HDL receptor ATP synthase mRNA and protein, and significant reduction of SR-BI protein despite its normal mRNA abundance. The reduction in SR-BI protein levels in animals with NS was accompanied by parallel reductions in PDZK1 mRNA and protein levels (Vaziri et al. 2011). Rett syndrome, a genetic form of infantile autism, is the second most common cause of mental retardation in women (Amir et al. 1999). When compared to healthy subjects, patients with Rett syndrome present with significant increases in total cholesterol (12 %), LDL cholesterol (15 %), and HDL-C (18 %) (Sticozzi et al. 2013). Skin fibroblasts isolated from patients with Rett syndrome exhibited low levels of SR-BI as a consequence of its association with 4-hydroxy-2-nonenal (4HNE), a product of lipid peroxidation that is increased in patients with Rett syndrome, and increased ubiquitination (Sticozzi et al. 2013). The role of the proteasome in SR-BI stability was confirmed using the proteasomal inhibitor (MG132). When Rett syndrome fibroblasts were pretreated with MG132, the loss of SR-BI was reversed demonstrating that SR-BI is degraded via the proteasome machinery (Sticozzi et al. 2013).

In hepatic cells and fibroblasts, SR-BI protein levels and SR-BI-mediated cholesterol transport (export and uptake) were shown to be affected by the Ras/MEK/ERK signaling cascade. This effect was mediated via PPARα-inducible

degradation pathways (Wood et al. 2011). Metabolic labeling experiments in primary hepatocytes from mice demonstrated that fenofibrate enhances the degradation of SR-BI in a post-endoplasmic reticulum compartment (Lan and Silver 2005). Moreover, fenofibrate-induced degradation of SR-BI was independent of the proteasome, the calpain protease, or the lysosome (Lan and Silver 2005).

In primary macrophages and cell lines derived from female but not from male mice, tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen increased SR-BI protein expression via the estrogen receptor α (Dong et al. 2011). Because SR-BI mRNA expression and promoter activity were not influenced by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen, it was demonstrated that the regulation of SR-BI by these substances takes place at the level of protein stability (Dong et al. 2011).

The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway was shown to affect positively the SR-BI-mediated HDL selective cholesterol ester uptake into human HepG2 cells as this process was compromised in the presence of the PI3K inhibitors wortmannin and LY294002 (Shetty et al. 2006). These inhibitors also blocked the positive effect of insulin on the SR-BI-dependent selective uptake. HDL cell-surface binding, receptor biotinylation studies, and confocal fluorescence microscopy of HepG2 cells expressing green fluorescent protein-tagged SR-BI demonstrated changes in SR-BI subcellular localization and cell-surface expression as a result of PI3K activation (Shetty et al. 2006). These data indicate that PI3K activation stimulates hepatic SR-BI function posttranslationally by regulating the subcellular localization of SR-BI. It was recently shown that monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), a protein expressed by endothelial cells under inflammatory conditions, decreases the cell-surface protein expression of ABCA1, ABCG1, and SR-BI in a dose-dependent and time-dependent manner (Huang et al. 2013). It was shown that PI3K activation corrected the MCP-1-induced decreases in the cell-surface protein expression of the three transporters. MCP-1 decreased the lipid uptake by HepG2 cells and the ABCA1-mediated cholesterol efflux to apoA-I, and this was reversed by the activation of PI3K. These data suggested that MCP-1 impairs RCT activity in HepG2 cells by a PI3K-/AKT-mediated posttranslational regulation of ABCA1, ABCG1, and SR-BI cell-surface expression (Huang et al. 2013).

Finally, it was shown that hormones such as triiodothyronine (T3) and thyromimetics and some pharmacological agents such as probucol increase SR-BI levels posttranscriptionally (Leiva et al. 2011).

Conclusions

As discussed earlier in this chapter as well as in other chapters of this handbook, plasma HDL cholesterol levels are determined by the relative rates of HDL biogenesis and HDL catabolism which in turn are mediated by several lipid-carrying proteins, plasma enzymes, and membrane transporters. The deregulation of the activity or the expression of these proteins by mutations or during diseases is associated with non-physiological levels of HDL cholesterol, HDL dysfunction, and predisposition to coronary heart disease. Epidemiological studies as well as experiments in genetically modified animals have provided unequivocal proof that raising HDL cholesterol levels may be therapeutic. Drugs

that could specifically increase the rates of HDL biogenesis by inducing the levels of apoA-I, ABCA1, or LCAT are anticipated to be of great clinical benefit. Other HDL proteins such as ABCG1, ABCG5/G8, CETP, and LPL could also provide useful targets for HDL-based therapies that will interfere with HDL maturation or catabolism without compromising HDL functionality. The development of novel HDL-raising drugs that will capitalize on HDL biogenesis will certainly require a thorough understanding of the mechanisms and the molecules that are involved in HDL regulation at the transcriptional, posttranscriptional, or posttranslational level in hepatic cells as well as in other physiologically relevant cells such as the macrophages. For instance, understanding ABCA1 gene regulation in the macrophage has led to the elucidation of the important role of LXRs and their ligands in the reverse cholesterol transport and the development of novel LXR ligands which however have severe lipogenic effects in the liver and are thus of no clinical value today so the challenge here is to develop more specific drugs that will avoid lipogenesis. Novel single- or dual-specificity agonists of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms are also anticipated. Understanding how the levels of HDL proteins and their functionality are affected by inflammatory factors will enable us to develop novel drugs to restore HDL levels and functionality and thus reduce the atherosclerotic burden in patients with chronic inflammatory diseases.

In summary, the current challenges in the HDL field are to develop novel therapies that would raise HDL cholesterol levels without compromising HDL functionality and to identify novel HDL-based biomarkers. The advances in the field of HDL regulation may provide crucial insights and tools to achieve this goal.

Acknowledgments This work was supported by the European Cooperation in Science and Technology (COST) Action BM0904; by grants from the Greek Secretariat for Research and Technology (SYNERGASIA-09 and THALIS MIS377286) to Dimitris Kardassis; by grants from the Spanish Instituto de Salud Carlos III (FIS, PI11/00315) to Alberto Dávalos; by a grant of the Romanian National Authority for Scientific Research, CNCS – UEFISCDI, project number PN-II-ID-PCE-2011-3-0591, and the Romanian Academy to Anca Gafencu; and by an NIH grant HL-48739 to Vassilis I. Zannis. We thank Dr. Ovidiu Croitoru for the graphic design.

Open Access This chapter is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License, which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

References

Adcock IM, Caramori G (2001) Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. Immunol Cell Biol 79:376–384

Adlakha YK, Khanna S, Singh R, Singh VP, Agrawal A, Saini N (2013) Pro-apoptotic miRNA-128-2 modulates ABCA1, ABCG1 and RXRalpha expression and cholesterol homeostasis. Cell Death Dis 4:e780

Agellon LB, Zhang P, Jiang XC, Mendelsohn L, Tall AR (1992) The CCAAT/enhancer-binding protein trans-activates the human cholesteryl ester transfer protein gene promoter. J Biol Chem 267:22336–22339

Aiello RJ, Brees D, Bourassa PA, Royer L, Lindsey S, Coskran T et al (2002) Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol 22:630–637

Albers M, Blume B, Schlueter T, Wright MB, Kober I, Kremoser C et al (2006) A novel principle for partial agonism of liver X receptor ligands. Competitive recruitment of activators and repressors. J Biol Chem 281:4920–4930

Alfaro Leon ML, Evans GF, Farmen MW, Zuckerman SH (2005) Post-transcriptional regulation of macrophage ABCA1, an early response gene to IFN-gamma. Biochem Biophys Res Commun 333:596–602

Ali K, Middleton M, Pure E, Rader DJ (2005) Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo. Circ Res 97:922–927

Allan CM, Walker D, Segrest JP, Taylor JM (1995a) Identification and characterization of a new human gene (APOC4) in the apolipoprotein E, C-I, and C-II gene locus. Genomics 28:291–300

Allan CM, Walker D, Taylor JM (1995b) Evolutionary duplication of a hepatic control region in the human apolipoprotein E gene locus. Identification of a second region that confers high level and liver-specific expression of the human apolipoprotein E gene in transgenic mice. J Biol Chem 270:26278–26281

Allegra A, Alonci A, Campo S, Penna G, Petrungaro A, Gerace D et al (2012) Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review). Int J Oncol 41:1897–1912

Allen RM, Marquart TJ, Albert CJ, Suchy FJ, Wang DQ, Ananthanarayanan M et al (2012) miR-33 controls the expression of biliary transporters, and mediates statin- and diet-induced hepatotoxicity. EMBO Mol Med 4:882–895

Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. Nat Genet 23:185–188

Arakawa R, Yokoyama S (2002) Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation. J Biol Chem 277: 22426–22429

Arakawa R, Hayashi M, Remaley AT, Brewer BH, Yamauchi Y, Yokoyama S (2004) Phosphorylation and stabilization of ATP binding cassette transporter A1 by synthetic amphiphilic helical peptides. J Biol Chem 279:6217–6220

Argmann CA, Van Den Diepstraten CH, Sawyez CG, Edwards JY, Hegele RA, Wolfe BM et al (2001) Transforming growth factor-beta1 inhibits macrophage cholesteryl ester accumulation induced by native and oxidized VLDL remnants. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21: 2011–2018

Arkensteijn BW, Berbee JF, Rensen PC, Nielsen LB, Christoffersen C (2013) The apolipoprotein m-sphingosine-1-phosphate axis: biological relevance in lipoprotein metabolism, lipid disorders and atherosclerosis. Int J Mol Sci 14:4419–4431

Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF et al (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. Proc Natl Acad Sci USA 108:5003–5008

Axler O, Ahnstrom J, Dahlback B (2008) Apolipoprotein M associates to lipoproteins through its retained signal peptide. FEBS Lett 582:826–828

Back SS, Kim J, Choi D, Lee ES, Choi SY, Han K (2013) Cooperative transcriptional activation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 genes by nuclear receptors including Liver-X-Receptor. BMB Rep 46:322–327

Baldan A, Pei L, Lee R, Tarr P, Tangirala RK, Weinstein MM et al (2006) Impaired development of atherosclerosis in hyperlipidemic Ldlr−/− and ApoE−/− mice transplanted with Abcg1−/− bone marrow. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26:2301–2307

Bao Y, Yang Y, Wang L, Gao L, Jiang W, Wang L et al (2009) Identification of trichostatin A as a novel transcriptional up-regulator of scavenger receptor BI both in HepG2 and RAW 264.7 cells. Atherosclerosis 204:127–135

Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 136:215–233

Basu SK, Brown MS, Ho YK, Havel RJ, Goldstein JL (1981) Mouse macrophages synthesize and secrete a protein resembling apolipoprotein E. Proc Natl Acad Sci USA 78:7545–7549

Bavner A, Sanyal S, Gustafsson JA, Treuter E (2005) Transcriptional corepression by SHP: molecular mechanisms and physiological consequences. Trends Endocrinol Metab 16: 478–488

Belalcazar LM, Merched A, Carr B, Oka K, Chen KH, Pastore L et al (2003) Long-term stable expression of human apolipoprotein A-I mediated by helper-dependent adenovirus gene transfer inhibits atherosclerosis progression and remodels atherosclerotic plaques in a mouse model of familial hypercholesterolemia. Circulation 107:2726–2732

Bellosta S, Mahley RW, Sanan DA, Murata J, Newland DL, Taylor JM et al (1995) Macrophage-specific expression of human apolipoprotein E reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice. J Clin Invest 96:2170–2179

Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J et al (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. Science 290: 1771–1775

Bernstein BE, Birney E, Dunham I, Green ED, Gunter C, Snyder M (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature 489:57–74

Biddinger SB, Haas JT, Yu BB, Bezy O, Jing E, Zhang W et al (2008) Hepatic insulin resistance directly promotes formation of cholesterol gallstones. Nat Med 14:778–782

Blumberg B, Evans RM (1998) Orphan nuclear receptors – new ligands and new possibilities. Genes Dev 12:3149–3155

Bouly M, Masson D, Gross B, Jiang XC, Fievet C, Castro G et al (2001) Induction of the phospholipid transfer protein gene accounts for the high density lipoprotein enlargement in mice treated with fenofibrate. J Biol Chem 276:25841–25847

Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H (2000) Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. Trends Pharmacol Sci 21:381–388

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E et al (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 99:15524–15529

Calkin AC, Tontonoz P (2012) Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. Nat Rev Mol Cell Biol 13:213–224

Cao G, Garcia CK, Wyne KL, Schultz RA, Parker KL, Hobbs HH (1997) Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. J Biol Chem 272:33068–33076

Cao G, Beyer TP, Yang XP, Schmidt RJ, Zhang Y, Bensch WR et al (2002) Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo. J Biol Chem 277:39561–39565

Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell 136:642–655

Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, Santini T, Sthandier O, Chinappi M et al (2011) A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. Cell 147:358–369

Chang DJ, Paik YK, Leren TP, Walker DW, Howlett GJ, Taylor JM (1990) Characterization of a human apolipoprotein E gene enhancer element and its associated protein factors. J Biol Chem 265:9496–9504

Chao F, Gong W, Zheng Y, Li Y, Huang G, Gao M et al (2010) Upregulation of scavenger receptor class B type I expression by activation of FXR in hepatocyte. Atherosclerosis 213:443–448

Chellan B, Yan L, Sontag TJ, Reardon CA, Hofmann Bowman MA (2013) IL-22 is induced by S100/calgranulin and impairs cholesterol efflux in macrophages by down regulating ABCG1. J Lipid Res 55:443–454

Chen JD, Li H (1998) Coactivation and corepression in transcriptional regulation by steroid/nuclear hormone receptors. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 8:169–190

Chen WS, Manova K, Weinstein DC, Duncan SA, Plump AS, Prezioso VR et al (1994) Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. Genes Dev 8:2466–2477

Chen H, Rossier C, Lalioti MD, Lynn A, Chakravarti A, Perrin G et al (1996) Cloning of the cDNA for a human homologue of the Drosophila white gene and mapping to chromosome 21q22.3. Am J Hum Genet 59:66–75

Chen W, Wang N, Tall AR (2005) A PEST deletion mutant of ABCA1 shows impaired internalization and defective cholesterol efflux from late endosomes. J Biol Chem 280:29277–29281

Chen HY, Xu Z, Chen LF, Wang W, Fang Q, Yan XW (2012a) Valsartan and telmisartan abrogate angiotensin II-induced downregulation of ABCA1 expression via AT1 receptor, rather than AT2 receptor or PPARgamma activation. J Cardiovasc Pharmacol 59:570–575

Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY (2012b) Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. Trends Cell Biol 22:125–132

Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP et al (2001) PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. Nat Med 7:53–58

Christoffersen C, Nielsen LB (2013) Apolipoprotein M: bridging HDL and endothelial function. Curr Opin Lipidol 24:295–300

Christoffersen C, Ahnstrom J, Axler O, Christensen EI, Dahlback B, Nielsen LB (2008) The signal peptide anchors apolipoprotein M in plasma lipoproteins and prevents rapid clearance of apolipoprotein M from plasma. J Biol Chem 283:18765–18772

Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, Galvani S, Ahnstrom J, Sevvana M et al (2011) Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. Proc Natl Acad Sci USA 108:9613–9618

Christova R (2013) Detecting DNA-protein interactions in living cells-ChIP approach. Adv Protein Chem Struct Biol 91:101–133

Churko JM, Mantalas GL, Snyder MP, Wu JC (2013) Overview of high throughput sequencing technologies to elucidate molecular pathways in cardiovascular diseases. Circ Res 112: 1613–1623

Cifuentes D, Xue H, Taylor DW, Patnode H, Mishima Y, Cheloufi S et al (2010) A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. Science 328: 1694–1698

Claudel T, Sturm E, Duez H, Torra IP, Sirvent A, Kosykh V et al (2002) Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. J Clin Invest 109:961–971

Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR (2000) Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. J Biol Chem 275:28240–28245

Costet P, Lalanne F, Gerbod-Giannone MC, Molina JR, Fu X, Lund EG et al (2003) Retinoic acid receptor-mediated induction of ABCA1 in macrophages. Mol Cell Biol 23:7756–7766

Cui L, Schoene NW, Zhu L, Fanzo JC, Alshatwi A, Lei KY (2002) Zinc depletion reduced Egr-1 and HNF-3beta expression and apolipoprotein A-I promoter activity in Hep G2 cells. Am J Physiol Cell Physiol 283:C623–C630

Dahlback B, Nielsen LB (2009) Apolipoprotein M affecting lipid metabolism or just catching a ride with lipoproteins in the circulation? Cell Mol Life Sci 66:559–564

Davalos A, Chroni A (2014) Antisense oligonucleotides, microRNAs and antibodies. In: von Eckardstein A, Kardassis D (eds) High density lipoproteins – from biological understanding to clinical exploitation. Springer, Heidelberg

Davalos A, Fernandez-Hernando C (2013) From evolution to revolution: miRNAs as pharmacological targets for modulating cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. Pharmacol Res 75:60–72

Davalos A, Goedeke L, Smibert P, Ramirez CM, Warrier NP, Andreo U et al (2011) miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. Proc Natl Acad Sci USA 108:9232–9237

Davignon J (2005) Apolipoprotein E and atherosclerosis: beyond lipid effect. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:267–269

Day JR, Albers JJ, Lofton-Day CE, Gilbert TL, Ching AF, Grant FJ et al (1994) Complete cDNA encoding human phospholipid transfer protein from human endothelial cells. J Biol Chem 269: 9388–9391

de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Kim T, Civelek M, Baldan A, Esau C et al (2013) MicroRNA-144 regulates hepatic ATP binding cassette transporter A1 and plasma high-density lipoprotein after activation of the nuclear receptor farnesoid X receptor. Circ Res 112:1602–1612

del Castillo-Olivares A, Gil G (2000) Alpha 1-fetoprotein transcription factor is required for the expression of sterol 12alpha-hydroxylase, the specific enzyme for cholic acid synthesis. Potential role in the bile acid-mediated regulation of gene transcription. J Biol Chem 275: 17793–17799

Delerive P, Galardi CM, Bisi JE, Nicodeme E, Goodwin B (2004) Identification of liver receptor homolog-1 as a novel regulator of apolipoprotein AI gene transcription. Mol Endocrinol 18: 2378–2387

Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A et al (2012) Landscape of transcription in human cells. Nature 489:101–108

Dong P, Xie T, Zhou X, Hu W, Chen Y, Duan Y et al (2011) Induction of macrophage scavenger receptor type BI expression by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen. Atherosclerosis 218:435–442

Duez H, Lefebvre B, Poulain P, Torra IP, Percevault F, Luc G et al (2005) Regulation of human apoA-I by gemfibrozil and fenofibrate through selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha modulation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:585–591

Durrington PN, Mackness MI, Bhatnagar D, Julier K, Prais H, Arrol S et al (1998) Effects of two different fibric acid derivatives on lipoproteins, cholesteryl ester transfer, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type IIb hyperlipoproteinaemia. Atherosclerosis 138:217–225

Ecker J, Langmann T, Moehle C, Schmitz G (2007) Isomer specific effects of Conjugated Linoleic Acid on macrophage ABCG1 transcription by a SREBP-1c dependent mechanism. Biochem Biophys Res Commun 352:805–811

Edgel KA, Leboeuf RC, Oram JF (2010) Tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha increase macrophage ABCA1 by gene expression and protein stabilization via different receptors. Atherosclerosis 209:387–392

Engel T, Lueken A, Bode G, Hobohm U, Lorkowski S, Schlueter B et al (2004) ADP-ribosylation factor (ARF)-like 7 (ARL7) is induced by cholesterol loading and participates in apolipoprotein AI-dependent cholesterol export. FEBS Lett 566:241–246

Engel T, Bode G, Lueken A, Knop M, Kannenberg F, Nofer JR et al (2006) Expression and functional characterization of ABCG1 splice variant ABCG1(666). FEBS Lett 580:4551–4559

Ettinger WH, Varma VK, Sorci-Thomas M, Parks JS, Sigmon RC, Smith TK et al (1994) Cytokines decrease apolipoprotein accumulation in medium from Hep G2 cells. Arterioscler Thromb 14:8–13

Fayard E, Auwerx J, Schoonjans K (2004) LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. Trends Cell Biol 14:250–260

Fazio S, Babaev VR, Murray AB, Hasty AH, Carter KJ, Gleaves LA et al (1997) Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 94:4647–4652

Feingold KR, Shigenaga JK, Chui LG, Moser A, Khovidhunkit W, Grunfeld C (2008) Infection and inflammation decrease apolipoprotein M expression. Atherosclerosis 199:19–26

Fitzgerald ML, Mujawar Z, Tamehiro N (2010) ABC transporters, atherosclerosis and inflammation. Atherosclerosis 211:361–370

Frankel LB, Lund AH (2012) MicroRNA regulation of autophagy. Carcinogenesis 33:2018–2025

Freeman LA, Kennedy A, Wu J, Bark S, Remaley AT, Santamarina-Fojo S et al (2004) The orphan nuclear receptor LRH-1 activates the ABCG5/ABCG8 intergenic promoter. J Lipid Res 45: 1197–1206

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res 19:92–105

Frisdal E, Lesnik P, Olivier M, Robillard P, Chapman MJ, Huby T et al (2011) Interleukin-6 protects human macrophages from cellular cholesterol accumulation and attenuates the proinflammatory response. J Biol Chem 286:30926–30936

Fu X, Menke JG, Chen Y, Zhou G, MacNaul KL, Wright SD et al (2001) 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. J Biol Chem 276: 38378–38387

Fukata Y, Yu X, Imachi H, Nishiuchi T, Lyu J, Seo K et al (2013) 17β-Estradiol regulates scavenger receptor class BI gene expression via protein kinase C in vascular endothelial cells. Endocrine 46:644–650

Gafencu AV, Robciuc MR, Fuior E, Zannis VI, Kardassis D, Simionescu M (2007) Inflammatory signaling pathways regulating ApoE gene expression in macrophages. J Biol Chem 282: 21776–21785

Gan X, Kaplan R, Menke JG, MacNaul K, Chen Y, Sparrow CP et al (2001) Dual mechanisms of ABCA1 regulation by geranylgeranyl pyrophosphate. J Biol Chem 276:48702–48708

Garcia MA, Vazquez J, Gimenez C, Valdivieso F, Zafra F (1996) Transcription factor AP-2 regulates human apolipoprotein E gene expression in astrocytoma cells. J Neurosci 16: 7550–7556

Gaudet F, Ginsburg GS (1995) Transcriptional regulation of the cholesteryl ester transfer protein gene by the orphan nuclear hormone receptor apolipoprotein AI regulatory protein-1. J Biol Chem 270:29916–29922

Gauthier B, Robb M, Gaudet F, Ginsburg GS, McPherson R (1999) Characterization of a cholesterol response element (CRE) in the promoter of the cholesteryl ester transfer protein gene: functional role of the transcription factors SREBP-1a, -2, and YY1. J Lipid Res 40: 1284–1293

Gautier T, de Haan W, Grober J, Ye D, Bahr MJ, Claudel T et al (2013) Farnesoid X receptor activation increases cholesteryl ester transfer protein expression in humans and transgenic mice. J Lipid Res 54:2195–2205

Gavrilov A, Eivazova E, Priozhkova I, Lipinski M, Razin S, Vassetzky Y (2009) Chromosome conformation capture (from 3C to 5C) and its ChIP-based modification. Methods Mol Biol 567:171–188

Georgopoulos S, Kan HY, Reardon-Alulis C, Zannis V (2000) The SP1 sites of the human apoCIII enhancer are essential for the expression of the apoCIII gene and contribute to the hepatic and intestinal expression of the apoA-I gene in transgenic mice. Nucleic Acids Res 28:4919–4929

Gerbod-Giannone MC, Li Y, Holleboom A, Han S, Hsu LC, Tabas I et al (2006) TNFalpha induces ABCA1 through NF-kappaB in macrophages and in phagocytes ingesting apoptotic cells. Proc Natl Acad Sci USA 103:3112–3117

Gerin I, Clerbaux LA, Haumont O, Lanthier N, Das AK, Burant CF et al (2010) Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. J Biol Chem 285:33652–33661

Goldstein I, Ezra O, Rivlin N, Molchadsky A, Madar S, Goldfinger N et al (2012) p53, a novel regulator of lipid metabolism pathways. J Hepatol 56:656–662

Grainger DJ, Reckless J, McKilligin E (2004) Apolipoprotein E modulates clearance of apoptotic bodies in vitro and in vivo, resulting in a systemic proinflammatory state in apolipoprotein E-deficient mice. J Immunol 173:6366–6375

Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. Nat Rev Drug Discov 3:950–964

Gu HM, Li G, Gao X, Berthiaume LG, Zhang DW (2013) Characterization of palmitoylation of ATP binding cassette transporter G1: effect on protein trafficking and function. Biochim Biophys Acta 1831:1067–1078

Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. Nature 466:835–840

Haas MJ, Mooradian AD (2010) Therapeutic interventions to enhance apolipoprotein A-I-mediated cardioprotection. Drugs 70:805–821

Hadzopoulou-Cladaras M, Lavrentiadou SN, Zannis VI, Kardassis D (1998) Transactivation of the ApoCIII promoter by ATF-2 and repression by members of the Jun family. Biochemistry 37: 14078–14087

Haghpassand M, Bourassa PA, Francone OL, Aiello RJ (2001) Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. J Clin Invest 108:1315–1320

Haidar B, Kiss RS, Sarov-Blat L, Brunet R, Harder C, McPherson R et al (2006) Cathepsin D, a lysosomal protease, regulates ABCA1-mediated lipid efflux. J Biol Chem 281:39971–39981

Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK et al (2013) Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. Nature 495:384–388

Hargrove GM, Junco A, Wong NC (1999) Hormonal regulation of apolipoprotein AI. J Mol Endocrinol 22:103–111

Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM, Gonzalez FJ (2001) Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. Mol Cell Biol 21:1393–1403

Helal O, Berrougui H, Loued S, Khalil A (2013) Extra-virgin olive oil consumption improves the capacity of HDL to mediate cholesterol efflux and increases ABCA1 and ABCG1 expression in human macrophages. Br J Nutr 109:1844–1855

Helsen C, Kerkhofs S, Clinckemalie L, Spans L, Laurent M, Boonen S et al (2012) Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. Mol Cell Endocrinol 348:411–417

Helwak A, Kudla G, Dudnakova T, Tollervey D (2013) Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. Cell 153:654–665

Hoang MH, Jia Y, Jun HJ, Lee JH, Lee BY, Lee SJ (2012) Fucosterol is a selective liver X receptor modulator that regulates the expression of key genes in cholesterol homeostasis in macrophages, hepatocytes, and intestinal cells. J Agric Food Chem 60:11567–11575

Honzumi S, Shima A, Hiroshima A, Koieyama T, Ubukata N, Terasaka N (2010) LXRalpha regulates human CETP expression in vitro and in transgenic mice. Atherosclerosis 212: 139–145

Horie T, Ono K, Horiguchi M, Nishi H, Nakamura T, Nagao K et al (2010) MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 107:17321–17326

Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Chujo Y, Watanabe S, Kinoshita M et al (2012) MicroRNA-33 deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in ApoE−/− mice. J Am Heart Assoc 1:e003376

Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M et al (2013) MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice. Nat Commun 4:2883

Horiuchi K, Tajima S, Menju M, Yamamoto A (1989) Structure and expression of mouse apolipoprotein E gene. J Biochem 106:98–103

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest 109:1125–1131

Hozoji M, Munehira Y, Ikeda Y, Makishima M, Matsuo M, Kioka N et al (2008) Direct interaction of nuclear liver X receptor-beta with ABCA1 modulates cholesterol efflux. J Biol Chem 283: 30057–30063

Hozoji-Inada M, Munehira Y, Nagao K, Kioka N, Ueda K (2011) Liver X receptor beta (LXRbeta) interacts directly with ATP-binding cassette A1 (ABCA1) to promote high density lipoprotein formation during acute cholesterol accumulation. J Biol Chem 286:20117–20124

Hu Y, Ren X, Wang H, Ma Y, Wang L, Shen Y et al (2010a) Liver-specific expression of an exogenous gene controlled by human apolipoprotein A-I promoter. Int J Pharm 398:161–164

Hu YW, Wang Q, Ma X, Li XX, Liu XH, Xiao J et al (2010b) TGF-beta1 up-regulates expression of ABCA1, ABCG1 and SR-BI through liver X receptor alpha signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells. J Atheroscler Thromb 17:493–502

Hu Z, Shen WJ, Kraemer FB, Azhar S (2012) MicroRNAs 125a and 455 repress lipoprotein-supported steroidogenesis by targeting scavenger receptor class B type I in steroidogenic cells. Mol Cell Biol 32:5035–5045

Hu Z, Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Yun CC, Berlot CH et al (2013) Regulation of expression and function of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) by Na^+/H^+ exchanger regulatory factors (NHERFs). J Biol Chem 288:11416–11435

Huang CX, Zhang YL, Wang JF, Jiang JY, Bao JL (2013) MCP-1 impacts RCT by repressing ABCA1, ABCG1, and SR-BI through PI3K/Akt posttranslational regulation in HepG2 cells. J Lipid Res 54:1231–1240

Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L et al (2008) Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. PLoS ONE 3:e3694

Huuskonen J, Abedin M, Vishnu M, Pullinger CR, Baranzini SE, Kane JP et al (2003) Dynamic regulation of alternative ATP-binding cassette transporter A1 transcripts. Biochem Biophys Res Commun 306:463–468

Huuskonen J, Vishnu M, Pullinger CR, Fielding PE, Fielding CJ (2004) Regulation of ATP-binding cassette transporter A1 transcription by thyroid hormone receptor. Biochemistry 43:1626–1632

Huwait EA, Greenow KR, Singh NN, Ramji DP (2011) A novel role for c-Jun N-terminal kinase and phosphoinositide 3-kinase in the liver X receptor-mediated induction of macrophage gene expression. Cell Signal 23:542–549

Ishibashi M, Filomenko R, Rebe C, Chevriaux A, Varin A, Derangere V et al (2013) Knock-down of the oxysterol receptor LXRalpha impairs cholesterol efflux in human primary macrophages: lack of compensation by LXRbeta activation. Biochem Pharmacol 86:122–129

Iwamoto N, Lu R, Tanaka N, Abe-Dohmae S, Yokoyama S (2010) Calmodulin interacts with ATP binding cassette transporter A1 to protect from calpain-mediated degradation and upregulates high-density lipoprotein generation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 30:1446–1452

Jean S, Kiger AA (2012) Coordination between RAB GTPase and phosphoinositide regulation and functions. Nat Rev Mol Cell Biol 13:463–470

Jeoung NH, Jang WG, Nam JI, Pak YK, Park YB (1999) Identification of retinoic acid receptor element in human cholesteryl ester transfer protein gene. Biochem Biophys Res Commun 258: 411–415

Jiang XC, Bruce C (1995) Regulation of murine plasma phospholipid transfer protein activity and mRNA levels by lipopolysaccharide and high cholesterol diet. J Biol Chem 270:17133–17138

Jiang XC, Moulin P, Quinet E, Goldberg IJ, Yacoub LK, Agellon LB et al (1991) Mammalian adipose tissue and muscle are major sources of lipid transfer protein mRNA. J Biol Chem 266:4631–4639

Jiang XC, Agellon LB, Walsh A, Breslow JL, Tall A (1992) Dietary cholesterol increases transcription of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice. Dependence on natural flanking sequences. J Clin Invest 90:1290–1295

Jiang XC, Jin W, Hussain MM (2012) The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on lipoprotein metabolism. Nutr Metab (Lond) 9:75

Jo DW, Leren TP, Yang ZY, Chung YH, Taylor JM, Paik YK (1995) Characterization of an upstream regulatory element of the human apolipoprotein E gene, and purification of its binding protein from the human placenta. J Biochem 117:915–922

Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R et al (2002a) Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. J Biol Chem 277:11019–11025

Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA et al (2002b) Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. Proc Natl Acad Sci USA 99: 7604–7609

Jun HJ, Hoang MH, Yeo SK, Jia Y, Lee SJ (2013) Induction of ABCA1 and ABCG1 expression by the liver X receptor modulator cineole in macrophages. Bioorg Med Chem Lett 23:579–583

Kammerer I, Ringseis R, Biemann R, Wen G, Eder K (2011) 13-hydroxy linoleic acid increases expression of the cholesterol transporters ABCA1, ABCG1 and SR-BI and stimulates apoA-I-dependent cholesterol efflux in RAW264.7 macrophages. Lipids Health Dis 10:222

Kan HY, Georgopoulos S, Zannis V (2000) A hormone response element in the human apolipoprotein CIII (ApoCIII) enhancer is essential for intestinal expression of the ApoA-I and ApoCIII genes and contributes to the hepatic expression of the two linked genes in transgenic mice. J Biol Chem 275:30423–30431

Kan HY, Georgopoulos S, Zanni M, Shkodrani A, Tzatsos A, Xie HX et al (2004) Contribution of the hormone-response elements of the proximal ApoA-I promoter, ApoCIII enhancer, and C/EBP binding site of the proximal ApoA-I promoter to the hepatic and intestinal expression of the ApoA-I and ApoCIII genes in transgenic mice. Biochemistry 43:5084–5093

Kang MH, Singaraja R, Hayden MR (2010) Adenosine-triphosphate-binding cassette transporter-1 trafficking and function. Trends Cardiovasc Med 20:41–49

Kang MH, Zhang LH, Wijesekara N, de Haan W, Butland S, Bhattacharjee A et al (2013) Regulation of ABCA1 protein expression and function in hepatic and pancreatic islet cells by miR-145. Arterioscler Thromb Vasc Biol 33:2724–2732

Kanter JE, Tang C, Oram JF, Bornfeldt KE (2012) Acyl-CoA synthetase 1 is required for oleate and linoleate mediated inhibition of cholesterol efflux through ATP-binding cassette transporter A1 in macrophages. Biochim Biophys Acta 1821:358–364

Kardassis D, Tzameli I, Hadzopoulou-Cladaras M, Talianidis I, Zannis V (1997) Distal apolipoprotein C-III regulatory elements F to J act as a general modular enhancer for proximal promoters that contain hormone response elements. Synergism between hepatic nuclear factor-4 molecules bound to the proximal promoter and distal enhancer sites. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17:222–232

Kardassis D, Falvey E, Tsantili P, Hadzopoulou-Cladaras M, Zannis V (2002) Direct physical interactions between HNF-4 and Sp1 mediate synergistic transactivation of the apolipoprotein CIII promoter. Biochemistry 41:1217–1228

Kardassis D, Drosatos C, Zannis V (2007) Regulation of genes involved in the biogenesis and the remodeling of HDL. In: Fielding CJ (ed) High-density lipoproteins from basic biology to clinical aspects. Wiley-VCH, Weinheim, pp 237–253

Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldan A, Tarr P, Fishbein MC et al (2005) ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. Cell Metab 1:121–131

Kielar D, Dietmaier W, Langmann T, Aslanidis C, Probst M, Naruszewicz M et al (2001) Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR. Clin Chem 47:2089–2097

Kilbourne EJ, Widom R, Harnish DC, Malik S, Karathanasis SK (1995) Involvement of early growth response factor Egr-1 in apolipoprotein AI gene transcription. J Biol Chem 270: 7004–7010

Kim J, Yoon H, Ramirez CM, Lee SM, Hoe HS, Fernandez-Hernando C (2012) MiR-106b impairs cholesterol efflux and increases Aβ levels by repressing ABCA1 expression. Exp Neurol 235: 476–483

Kinet V, Halkein J, Dirkx E, Windt LJ (2013) Cardiovascular extracellular microRNAs: emerging diagnostic markers and mechanisms of cell-to-cell RNA communication. Front Genet 4:214

Kir S, Zhang Y, Gerard RD, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ (2012) Nuclear receptors HNF4alpha and LRH-1 cooperate in regulating Cyp7a1 in vivo. J Biol Chem 287:41334–41341

Kocher O, Krieger M (2009) Role of the adaptor protein PDZK1 in controlling the HDL receptor SR-BI. Curr Opin Lipidol 20:236–241

Kocher O, Yesilaltay A, Cirovic C, Pal R, Rigotti A, Krieger M (2003) Targeted disruption of the PDZK1 gene in mice causes tissue-specific depletion of the high density lipoprotein receptor scavenger receptor class B type I and altered lipoprotein metabolism. J Biol Chem 278: 52820–52825

Krol J, Loedige I, Filipowicz W (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. Nat Rev Genet 11:597–610

Ku CS, Park Y, Coleman SL, Lee J (2012) Unsaturated fatty acids repress expression of ATP binding cassette transporter A1 and G1 in RAW 264.7 macrophages. J Nutr Biochem 23: 1271–1276

Kulyte A, Lorente-Cebrian S, Gao H, Mejhert N, Agustsson T, Arner P et al (2013) MicroRNA profiling links miR-378 to enhanced adipocyte lipolysis in human cancer cachexia. Am J Physiol Endocrinol Metab 306:E267–E274

Kuo CY, Lin YC, Yang JJ, Yang VC (2011) Interaction abolishment between mutant caveolin-1 (Delta62-100) and ABCA1 reduces HDL-mediated cellular cholesterol efflux. Biochem Biophys Res Commun 414:337–343

Ladias JA, Karathanasis SK (1991) Regulation of the apolipoprotein AI gene by ARP-1, a novel member of the steroid receptor superfamily. Science 251:561–565

Laffitte BA, Joseph SB, Walczak R, Pei L, Wilpitz DC, Collins JL et al (2001a) Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. Mol Cell Biol 21:7558–7568

Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ et al (2001b) LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. Proc Natl Acad Sci USA 98:507–512

Laffitte BA, Joseph SB, Chen M, Castrillo A, Repa J, Wilpitz D et al (2003) The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions. Mol Cell Biol 23:2182–2191

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. Curr Biol 12:735–739

Lakomy D, Rebe C, Sberna AL, Masson D, Gautier T, Chevriaux A et al (2009) Liver X receptor-mediated induction of cholesteryl ester transfer protein expression is selectively impaired in inflammatory macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol 29:1923–1929

Lambert G, Amar MJ, Guo G, Brewer HB Jr, Gonzalez FJ, Sinal CJ (2003) The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. J Biol Chem 278:2563–2570

Lan D, Silver DL (2005) Fenofibrate induces a novel degradation pathway for scavenger receptor B-I independent of PDZK1. J Biol Chem 280:23390–23396

Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G et al (1999) Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. Biochem Biophys Res Commun 257:29–33

Langmann T, Porsch-Ozcurumez M, Unkelbach U, Klucken J, Schmitz G (2000) Genomic organization and characterization of the promoter of the human ATP-binding cassette transporter-G1 (ABCG1) gene. Biochim Biophys Acta 1494:175–180

Langmann T, Porsch-Ozcurumez M, Heimerl S, Probst M, Moehle C, Taher M et al (2002) Identification of sterol-independent regulatory elements in the human ATP-binding cassette transporter A1 promoter: role of Sp1/3, E-box binding factors, and an oncostatin M-responsive element. J Biol Chem 277:14443–14450

Langmann T, Mauerer R, Zahn A, Moehle C, Probst M, Stremmel W et al (2003) Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. Clin Chem 49:230–238

Larkin L, Khachigian LM, Jessup W (2000) Regulation of apolipoprotein E production in macrophages (review). Int J Mol Med 6:253–258

Lavrentiadou SN, Hadzopoulou-Cladaras M, Kardassis D, Zannis VI (1999) Binding specificity and modulation of the human ApoCIII promoter activity by heterodimers of ligand-dependent nuclear receptors. Biochemistry 38:964–975

Le Goff W, Guerin M, Petit L, Chapman MJ, Thillet J (2003) Regulation of human CETP gene expression: role of SP1 and SP3 transcription factors at promoter sites −690, −629, and −37. J Lipid Res 44:1322–1331

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 75:843–854

Lee S, Wang PY, Jeong Y, Mangelsdorf DJ, Anderson RG, Michaely P (2012) Sterol-dependent nuclear import of ORP1S promotes LXR regulated trans-activation of apoE. Exp Cell Res 318:2128–2142

Leiva A, Verdejo H, Benitez ML, Martinez A, Busso D, Rigotti A (2011) Mechanisms regulating hepatic SR-BI expression and their impact on HDL metabolism. Atherosclerosis 217:299–307

Lemon B, Tjian R (2000) Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. Genes Dev 14:2551–2569

Li J, Ning G, Duncan SA (2000) Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. Genes Dev 14:464–474

Li X, Peegel H, Menon KM (2001) Regulation of high density lipoprotein receptor messenger ribonucleic acid expression and cholesterol transport in theca-interstitial cells by insulin and human chorionic gonadotropin. Endocrinology 142:174–181

Li D, Wang D, Wang Y, Ling W, Feng X, Xia M (2010a) Adenosine monophosphate-activated protein kinase induces cholesterol efflux from macrophage-derived foam cells and alleviates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. J Biol Chem 285:33499–33509

Li D, Zhang Y, Ma J, Ling W, Xia M (2010b) Adenosine monophosphate activated protein kinase regulates ABCG1-mediated oxysterol efflux from endothelial cells and protects against hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction. Arterioscler Thromb Vasc Biol 30: 1354–1362

Li G, Gu HM, Zhang DW (2013) ATP-binding cassette transporters and cholesterol translocation. IUBMB Life 65:505–512

Liang Y, Yang X, Ma L, Cai X, Wang L, Yang C et al (2013) Homocysteine-mediated cholesterol efflux via ABCA1 and ACAT1 DNA methylation in THP-1 monocyte-derived foam cells. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 45:220–228

Lin G, Bornfeldt KE (2002) Cyclic AMP-specific phosphodiesterase 4 inhibitors promote ABCA1 expression and cholesterol efflux. Biochem Biophys Res Commun 290:663–669

Lin S, Zhou C, Neufeld E, Wang YH, Xu SW, Lu L et al (2013) BIG1, a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein modulates ATP-binding cassette transporter A-1 trafficking and function. Arterioscler Thromb Vasc Biol 33:e31–e38

Linder MD, Mayranpaa MI, Peranen J, Pietila TE, Pietiainen VM, Uronen RL et al (2009) Rab8 regulates ABCA1 cell surface expression and facilitates cholesterol efflux in primary human macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol 29:883–888

Linton MF, Atkinson JB, Fazio S (1995) Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. Science 267:1034–1037

Liu C, Lin JD (2011) PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 43:248–257

Liu S, Tetzlaff MT, Cui R, Xu X (2012) miR-200c inhibits melanoma progression and drug resistance through down-regulation of BMI-1. Am J Pathol 181:1823–1835

Lopez D, McLean MP (1999) Sterol regulatory element-binding protein-1a binds to cis elements in the promoter of the rat high density lipoprotein receptor SR-BI gene. Endocrinology 140: 5669–5681

Lopez D, McLean MP (2006) Estrogen regulation of the scavenger receptor class B gene: anti-atherogenic or steroidogenic, is there a priority? Mol Cell Endocrinol 247:22–33

Lopez D, Sandhoff TW, McLean MP (1999) Steroidogenic factor-1 mediates cyclic 3′,5-′-adenosine monophosphate regulation of the high density lipoprotein receptor. Endocrinology 140:3034–3044

Lopez D, Shea-Eaton W, Sanchez MD, McLean MP (2001) DAX-1 represses the high-density lipoprotein receptor through interaction with positive regulators sterol regulatory element-binding protein-1a and steroidogenic factor-1. Endocrinology 142:5097–5106

Lopez D, Sanchez MD, Shea-Eaton W, McLean MP (2002) Estrogen activates the high-density lipoprotein receptor gene via binding to estrogen response elements and interaction with sterol regulatory element binding protein-1A. Endocrinology 143:2155–2168

Lu R, Arakawa R, Ito-Osumi C, Iwamoto N, Yokoyama S (2008) ApoA-I facilitates ABCA1 recycle/accumulation to cell surface by inhibiting its intracellular degradation and increases HDL generation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 28:1820–1824

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. Science 303:95–98

Luo Y, Tall AR (2000) Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. J Clin Invest 105:513–520

Luo Y, Liang CP, Tall AR (2001) The orphan nuclear receptor LRH-1 potentiates the sterol-mediated induction of the human CETP gene by liver X receptor. J Biol Chem 276: 24767–24773

Ma AZ, Zhang Q, Song ZY (2013) TNFa alter cholesterol metabolism in human macrophages via PKC-theta-dependent pathway. BMC Biochem 14:20

Maitra U, Li L (2013) Molecular mechanisms responsible for the reduced expression of cholesterol transporters from macrophages by low-dose endotoxin. Arterioscler Thromb Vasc Biol 33:24–33

Mak PA, Kast-Woelbern HR, Anisfeld AM, Edwards PA (2002a) Identification of PLTP as an LXR target gene and apoE as an FXR target gene reveals overlapping targets for the two nuclear receptors. J Lipid Res 43:2037–2041

Mak PA, Laffitte BA, Desrumaux C, Joseph SB, Curtiss LK, Mangelsdorf DJ et al (2002b) Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. J Biol Chem 277:31900–31908

Malekpour-Dehkordi Z, Javadi E, Doosti M, Paknejad M, Nourbakhsh M, Yassa N et al (2013) S-Allylcysteine, a garlic compound, increases ABCA1 expression in human THP-1 macrophages. Phytother Res 27:357–361

Malerod L, Juvet LK, Hanssen-Bauer A, Eskild W, Berg T (2002) Oxysterol-activated LXRalpha/RXR induces hSR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes. Biochem Biophys Res Commun 299:916–923

Malerod L, Sporstol M, Juvet LK, Mousavi A, Gjoen T, Berg T (2003) Hepatic scavenger receptor class B, type I is stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and hepatocyte nuclear factor 4alpha. Biochem Biophys Res Commun 305:557–565

Malerod L, Sporstol M, Juvet LK, Mousavi SA, Gjoen T, Berg T et al (2005) Bile acids reduce SR-BI expression in hepatocytes by a pathway involving FXR/RXR, SHP, and LRH-1. Biochem Biophys Res Commun 336:1096–1105

Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, Baldan A (2010) miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. Proc Natl Acad Sci USA 107:12228–12232

Martinez LO, Agerholm-Larsen B, Wang N, Chen W, Tall AR (2003) Phosphorylation of a pest sequence in ABCA1 promotes calpain degradation and is reversed by ApoA-I. J Biol Chem 278:37368–37374

Masson D, Qatanani M, Sberna AL, Xiao R, Pais de Barros JP, Grober J et al (2008) Activation of the constitutive androstane receptor decreases HDL in wild-type and human apoA-I transgenic mice. J Lipid Res 49:1682–1691

Mataki C, Magnier BC, Houten SM, Annicotte JS, Argmann C, Thomas C et al (2007) Compromised intestinal lipid absorption in mice with a liver-specific deficiency of liver receptor homolog 1. Mol Cell Biol 27:8330–8339

Mattick JS, Makunin IV (2005) Small regulatory RNAs in mammals. Hum Mol Genet 14(Spec No 1):R121–R132

Mauerer R, Ebert S, Langmann T (2009) High glucose, unsaturated and saturated fatty acids differentially regulate expression of ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1 in human macrophages. Exp Mol Med 41:126–132

Mavridou S, Venihaki M, Rassouli O, Tsatsanis C, Kardassis D (2010) Feedback inhibition of human scavenger receptor class B type I gene expression by glucocorticoid in adrenal and ovarian cells. Endocrinology 151:3214–3224

Meister G (2013) Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. Nat Rev Genet 14: 447–459

Mendell JT, Olson EN (2012) MicroRNAs in stress signaling and human disease. Cell 148: 1172–1187

Meurs I, Lammers B, Zhao Y, Out R, Hildebrand RB, Hoekstra M et al (2012) The effect of ABCG1 deficiency on atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice depends on the stage of atherogenesis. Atherosclerosis 221:41–47

Mitchell PJ, Tjian R (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. Science 245:371–378

Miyake Y, Kozutsumi Y, Nakamura S, Fujita T, Kawasaki T (1995) Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. Biochem Biophys Res Commun 211:396–403

Miyazaki T, Koya T, Kigawa Y, Oguchi T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR et al (2013) Calpain and atherosclerosis. J Atheroscler Thromb 20:228–237

Mizuno T, Hayashi H, Naoi S, Sugiyama Y (2011) Ubiquitination is associated with lysosomal degradation of cell surface-resident ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) through the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) pathway. Hepatology 54:631–643

Mooradian AD, Haas MJ, Wong NC (2004) Transcriptional control of apolipoprotein A-I gene expression in diabetes. Diabetes 53:513–520

Morishima A, Ohkubo N, Maeda N, Miki T, Mitsuda N (2003) NFkappaB regulates plasma apolipoprotein A-I and high density lipoprotein cholesterol through inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. J Biol Chem 278:38188–38193

Mosialou I, Zannis VI, Kardassis D (2010) Regulation of human apolipoprotein m gene expression by orphan and ligand-dependent nuclear receptors. J Biol Chem 285:30719–30730

Mosialou I, Krasagakis K, Kardassis D (2011) Opposite regulation of the human apolipoprotein M gene by hepatocyte nuclear factor 1 and Jun transcription factors. J Biol Chem 286: 17259–17269

Munehira Y, Ohnishi T, Kawamoto S, Furuya A, Shitara K, Imamura M et al (2004) Alpha1-syntrophin modulates turnover of ABCA1. J Biol Chem 279:15091–15095

Murao K, Wada Y, Nakamura T, Taylor AH, Mooradian AD, Wong NC (1998) Effects of glucose and insulin on rat apolipoprotein A-I gene expression. J Biol Chem 273:18959–18965

Murao K, Imachi H, Yu X, Cao WM, Muraoka T, Dobashi H et al (2008) The transcriptional factor prolactin regulatory element-binding protein mediates the gene transcription of adrenal scavenger receptor class B type I via 3′,5′-cyclic adenosine 5′-monophosphate. Endocrinology 149: 6103–6112

Myklebost O, Rogne S (1988) A physical map of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 19. Hum Genet 78:244–247

Nagelin MH, Srinivasan S, Lee J, Nadler JL, Hedrick CC (2008) 12/15-Lipoxygenase activity increases the degradation of macrophage ATP-binding cassette transporter G1. Arterioscler Thromb Vasc Biol 28:1811–1819

Nagelin MH, Srinivasan S, Nadler JL, Hedrick CC (2009) Murine 12/15-lipoxygenase regulates ATP-binding cassette transporter G1 protein degradation through p38- and JNK2-dependent pathways. J Biol Chem 284:31303–31314

Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE et al (2010) MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. Science 328: 1566–1569

Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R (1994) ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. Arterioscler Thromb 14: 133–140

Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P (1998) Multiple parameters determine the specificity of transcriptional response by nuclear receptors HNF-4, ARP-1, PPAR, RAR and RXR through common response elements. Nucleic Acids Res 26:2491–2499

Nielsen LB, Christoffersen C, Ahnstrom J, Dahlback B (2009) ApoM: gene regulation and effects on HDL metabolism. Trends Endocrinol Metab 20:66–71

Niemeier A, Kovacs WJ, Strobl W, Stangl H (2009) Atherogenic diet leads to posttranslational down-regulation of murine hepatocyte SR-BI expression. Atherosclerosis 202:169–175

Nikolaidou-Neokosmidou V, Zannis VI, Kardassis D (2006) Inhibition of hepatocyte nuclear factor 4 transcriptional activity by the nuclear factor kappaB pathway. Biochem J 398:439–450

Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Mutallip M, Fujimura L, Yoshino H et al (2011) Caveolin-1 mediates tumor cell migration and invasion and its regulation by miR-133a in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Oncol 38:209–217

Nonomura K, Arai Y, Mitani H, Abe-Dohmae S, Yokoyama S (2011) Insulin down-regulates specific activity of ATP-binding cassette transporter A1 for high density lipoprotein biogenesis through its specific phosphorylation. Atherosclerosis 216:334–341

Novak EM, Bydlowski SP (1997) NFY transcription factor binds to regulatory element AIC and transactivates the human apolipoprotein A-I promoter in HEPG2 cells. Biochem Biophys Res Commun 231:140–143

Okazaki H, Goldstein JL, Brown MS, Liang G (2010) LXR-SREBP-1c-phospholipid transfer protein axis controls very low density lipoprotein (VLDL) particle size. J Biol Chem 285: 6801–6810

Olaisen B, Teisberg P, Gedde-Dahl T Jr (1982) The locus for apolipoprotein E (apoE) is linked to the complement component C3 (C3) locus on chromosome 19 in man. Hum Genet 62:233–236

Oliver WR Jr, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL et al (2001) A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. Proc Natl Acad Sci USA 98:5306–5311

Orom UA, Nielsen FC, Lund AH (2008) MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. Mol Cell 30:460–471

Ouimet M, Franklin V, Mak E, Liao X, Tabas I, Marcel YL (2011) Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. Cell Metab 13: 655–667

Out R, Hoekstra M, Hildebrand RB, Kruit JK, Meurs I, Li Z et al (2006) Macrophage ABCG1 deletion disrupts lipid homeostasis in alveolar macrophages and moderately influences atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26:2295–2300

Out C, Hageman J, Bloks VW, Gerrits H, Sollewijn Gelpke MD, Bos T et al (2011) Liver receptor homolog-1 is critical for adequate up-regulation of Cyp7a1 gene transcription and bile salt synthesis during bile salt sequestration. Hepatology 53:2075–2085

Ozasa H, Ayaori M, Iizuka M, Terao Y, Uto-Kondo H, Yakushiji E et al (2011) Pioglitazone enhances cholesterol efflux from macrophages by increasing ABCA1/ABCG1 expressions via PPARgamma/LXRalpha pathway: findings from in vitro and ex vivo studies. Atherosclerosis 219:141–150

Paik YK, Chang DJ, Reardon CA, Walker MD, Taxman E, Taylor JM (1988) Identification and characterization of transcriptional regulatory regions associated with expression of the human apolipoprotein E gene. J Biol Chem 263:13340–13349

Pamir N, McMillen TS, Edgel KA, Kim F, LeBoeuf RC (2012) Deficiency of lymphotoxin-alpha does not exacerbate high-fat diet-induced obesity but does enhance inflammation in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 302:E961–E971

Pan X, Jiang XC, Hussain MM (2013) Impaired cholesterol metabolism and enhanced atherosclerosis in clock mutant mice. Circulation 128:1758–1769

Panousis CG, Zuckerman SH (2000) Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20:1565–1571

Panousis CG, Evans G, Zuckerman SH (2001) TGF-beta increases cholesterol efflux and ABC-1 expression in macrophage-derived foam cells: opposing the effects of IFN-gamma. J Lipid Res 42:856–863

Papazafiri P, Ogami K, Ramji DP, Nicosia A, Monaci P, Cladaras C et al (1991) Promoter elements and factors involved in hepatic transcription of the human ApoA-I gene positive and negative regulators bind to overlapping sites. J Biol Chem 266:5790–5797

Park SS, Choi H, Kim SJ, Kim OJ, Chae KS, Kim E (2008) FXRalpha down-regulates LXRalpha signaling at the CETP promoter via a common element. Mol Cells 26:409–414

Park DW, Lee HK, Lyu JH, Chin H, Kang SW, Kim YJ et al (2013) TLR2 stimulates ABCA1 expression via PKC-eta and PLD2 pathway. Biochem Biophys Res Commun 430:933–937

Parseghian S, Onstead-Haas LM, Wong NC, Mooradian AD, Haas MJ (2013) Inhibition of apolipoprotein A-I gene expression by tumor necrosis factor alpha in HepG2 cells: requirement for c-jun. J Cell Biochem 115:253–260

Pascual-Garcia M, Rue L, Leon T, Julve J, Carbo JM, Matalonga J et al (2013) Reciprocal negative cross-talk between liver X receptors (LXRs) and STAT1: effects on IFN-gamma-induced inflammatory responses and LXR-dependent gene expression. J Immunol 190:6520–6532

Paszty C, Maeda N, Verstuyft J, Rubin EM (1994) Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice. J Clin Invest 94:899–903

Peng D, Hiipakka RA, Dai Q, Guo J, Reardon CA, Getz GS et al (2008) Antiatherosclerotic effects of a novel synthetic tissue-selective steroidal liver X receptor agonist in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. J Pharmacol Exp Ther 327:332–342

Peng D, Hiipakka RA, Xie JT, Dai Q, Kokontis JM, Reardon CA et al (2011) A novel potent synthetic steroidal liver X receptor agonist lowers plasma cholesterol and triglycerides and reduces atherosclerosis in LDLR(−/−) mice. Br J Pharmacol 162:1792–1804

Phelan CA, Weaver JM, Steger DJ, Joshi S, Maslany JT, Collins JL et al (2008) Selective partial agonism of liver X receptor alpha is related to differential corepressor recruitment. Mol Endocrinol 22:2241–2249

Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP (2010) A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. Nature 465:1033–1038

Porsch-Ozcurumez M, Langmann T, Heimerl S, Borsukova H, Kaminski WE, Drobnik W et al (2001) The zinc finger protein 202 (ZNF202) is a transcriptional repressor of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 gene expression and a modulator of cellular lipid efflux. J Biol Chem 276:12427–12433

Quinet EM, Agellon LB, Kroon PA, Marcel YL, Lee YC, Whitlock ME et al (1990) Atherogenic diet increases cholesteryl ester transfer protein messenger RNA levels in rabbit liver. J Clin Invest 85:357–363

Quinet EM, Savio DA, Halpern AR, Chen L, Miller CP, Nambi P (2004) Gene-selective modulation by a synthetic oxysterol ligand of the liver X receptor. J Lipid Res 45:1929–1942

Radeau T, Lau P, Robb M, McDonnell M, Ailhaud G, McPherson R (1995) Cholesteryl ester transfer protein (CETP) mRNA abundance in human adipose tissue: relationship to cell size and membrane cholesterol content. J Lipid Res 36:2552–2561

Raffai RL, Loeb SM, Weisgraber KH (2005) Apolipoprotein E promotes the regression of atherosclerosis independently of lowering plasma cholesterol levels. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:436–441

Rajavashisth TB, Kaptein JS, Reue KL, Lusis AJ (1985) Evolution of apolipoprotein E: mouse sequence and evidence for an 11-nucleotide ancestral unit. Proc Natl Acad Sci USA 82: 8085–8089

Ramirez CM, Davalos A, Goedeke L, Salerno AG, Warrier N, Cirera-Salinas D et al (2011) MicroRNA-758 regulates cholesterol efflux through posttranscriptional repression of ATP-binding cassette transporter A1. Arterioscler Thromb Vasc Biol 31:2707–2714

Ramirez CM, Rotllan N, Vlassov AV, Davalos A, Li M, Goedeke L et al (2013) Control of cholesterol metabolism and plasma high-density lipoprotein levels by microRNA-144. Circ Res 112:1592–1601

Ranalletta M, Wang N, Han S, Yvan-Charvet L, Welch C, Tall AR (2006) Decreased atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice transplanted with Abcg1−/− bone marrow. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26:2308–2315

Rayner KJ, Suarez Y, Davalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N et al (2010) MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. Science 328:1570–1573

Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, McDaniel AL, Marshall SM, van Gils JM et al (2011a) Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. Nature 478:404–407

Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, Hussain FN, Temel RE, Parathath S et al (2011b) Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. J Clin Invest 121:2921–2931

Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. Genes Dev 16:1616–1626

Remaley AT, Bark S, Walts AD, Freeman L, Shulenin S, Annilo T et al (2002) Comparative genome analysis of potential regulatory elements in the ABCG5-ABCG8 gene cluster. Biochem Biophys Res Commun 295:276–282

Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ (2002) Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. J Biol Chem 277:18793–18800

Richter S, Shih DQ, Pearson ER, Wolfrum C, Fajans SS, Hattersley AT et al (2003) Regulation of apolipoprotein M gene expression by MODY3 gene hepatocyte nuclear factor-1alpha: haploinsufficiency is associated with reduced serum apolipoprotein M levels. Diabetes 52: 2989–2995

Rochel N, Ciesielski F, Godet J, Moman E, Roessle M, Peluso-Iltis C et al (2011) Common architecture of nuclear receptor heterodimers on DNA direct repeat elements with different spacings. Nat Struct Mol Biol 18:564–570

Rodriguez-Ubreva J, Ballestar E (2014) Chromatin immunoprecipitation. Methods Mol Biol 1094: 309–318

Roeder RG (1998) Role of general and gene-specific cofactors in the regulation of eukaryotic transcription. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 63:201–218

Roeder RG (2005) Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. FEBS Lett 579:909–915

Rottiers V, Obad S, Petri A, McGarrah R, Lindholm MW, Black JC et al (2013) Pharmacological inhibition of a microRNA family in nonhuman primates by a seed-targeting 8-mer antimiR. Sci Transl Med 5:212ra162

Rottman JN, Widom RL, Nadal-Ginard B, Mahdavi V, Karathanasis SK (1991) A retinoic acid-responsive element in the apolipoprotein AI gene distinguishes between two different retinoic acid response pathways. Mol Cell Biol 11:3814–3820

Rousselle A, Qadri F, Leukel L, Yilmaz R, Fontaine JF, Sihn G et al (2013) CXCL5 limits macrophage foam cell formation in atherosclerosis. J Clin Invest 123:1343–1347

Rubin EM, Ishida BY, Clift SM, Krauss RM (1991) Expression of human apolipoprotein A-I in transgenic mice results in reduced plasma levels of murine apolipoprotein A-I and the appearance of two new high density lipoprotein size subclasses. Proc Natl Acad Sci USA 88: 434–438

Sakai T, Kamanna VS, Kashyap ML (2001) Niacin, but not gemfibrozil, selectively increases LP-AI, a cardioprotective subfraction of HDL, in patients with low HDL cholesterol. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21:1783–1789

Salero E, Perez-Sen R, Aruga J, Gimenez C, Zafra F (2001) Transcription factors Zic1 and Zic2 bind and transactivate the apolipoprotein E gene promoter. J Biol Chem 276:1881–1888

Salero E, Gimenez C, Zafra F (2003) Identification of a non-canonical E-box motif as a regulatory element in the proximal promoter region of the apolipoprotein E gene. Biochem J 370:979–986

Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP (2011) A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? Cell 146:353–358

Sanoudou D, Duka A, Drosatos K, Hayes KC, Zannis VI (2009) Role of Esrrg in the fibrate-mediated regulation of lipid metabolism genes in human ApoA-I transgenic mice. Pharmacogenomics J 10:165–179

Santamarina-Fojo S, Peterson K, Knapper C, Qiu Y, Freeman L, Cheng JF et al (2000) Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. Proc Natl Acad Sci USA 97:7987–7992

Sanyal A, Lajoie BR, Jain G, Dekker J (2012) The long-range interaction landscape of gene promoters. Nature 489:109–113

Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Cole T, Sprecher DL, Cilla DD Jr, Balagtas CC et al (1996) Effects of regular and extended-release gemfibrozil on plasma lipoproteins and apolipoproteins in hypercholesterolemic patients with decreased HDL cholesterol levels. Atherosclerosis 127: 113–122

Schmitz G, Langmann T (2005) Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. Biochim Biophys Acta 1735:1–19

Schnall-Levin M, Zhao Y, Perrimon N, Berger B (2010) Conserved microRNA targeting in Drosophila is as widespread in coding regions as in 3′UTRs. Proc Natl Acad Sci USA 107: 15751–15756

Schoonjans K, Annicotte JS, Huby T, Botrugno OA, Fayard E, Ueda Y et al (2002) Liver receptor homolog 1 controls the expression of the scavenger receptor class B type I. EMBO Rep 3: 1181–1187

Schou J, Frikke-Schmidt R, Kardassis D, Thymiakou E, Nordestgaard BG, Jensen G et al (2012) Genetic variation in ABCG1 and risk of myocardial infarction and ischemic heart disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 32:506–515

Schreyer SA, Peschon JJ, LeBoeuf RC (1996) Accelerated atherosclerosis in mice lacking tumor necrosis factor receptor p55. J Biol Chem 271:26174–26178

Schreyer SA, Vick CM, LeBoeuf RC (2002) Loss of lymphotoxin-alpha but not tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in mice. J Biol Chem 277:12364–12368

Schwartz K, Lawn RM, Wade DP (2000) ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. Biochem Biophys Res Commun 274:794–802

Shea-Eaton W, Lopez D, McLean MP (2001) Yin yang 1 protein negatively regulates high-density lipoprotein receptor gene transcription by disrupting binding of sterol regulatory element binding protein to the sterol regulatory element. Endocrinology 142:49–58

Shetty S, Eckhardt ER, Post SR, van der Westhuyzen DR (2006) Phosphatidylinositol-3-kinase regulates scavenger receptor class B type I subcellular localization and selective lipid uptake in hepatocytes. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26:2125–2131

Shih SJ, Allan C, Grehan S, Tse E, Moran C, Taylor JM (2000) Duplicated downstream enhancers control expression of the human apolipoprotein E gene in macrophages and adipose tissue. J Biol Chem 275:31567–31572

Shih DQ, Bussen M, Sehayek E, Ananthanarayanan M, Shneider BL, Suchy FJ et al (2001) Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. Nat Genet 27:375–382

Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Horii R, Yamashita T, Sakai Y et al (2013) MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. J Virol 87:5270–5286

Singaraja RR, Bocher V, James ER, Clee SM, Zhang LH, Leavitt BR et al (2001) Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoAI-dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron 1. J Biol Chem 276:33969–33979

Singaraja RR, James ER, Crim J, Visscher H, Chatterjee A, Hayden MR (2005) Alternate transcripts expressed in response to diet reflect tissue-specific regulation of ABCA1. J Lipid Res 46:2061–2071

Singaraja RR, Visscher H, James ER, Chroni A, Coutinho JM, Brunham LR et al (2006) Specific mutations in ABCA1 have discrete effects on ABCA1 function and lipid phenotypes both in vivo and in vitro. Circ Res 99:389–397

Singaraja RR, Kang MH, Vaid K, Sanders SS, Vilas GL, Arstikaitis P et al (2009) Palmitoylation of ATP-binding cassette transporter A1 is essential for its trafficking and function. Circ Res 105:138–147

Singh NN, Ramji DP (2006) Transforming growth factor-beta-induced expression of the apolipoprotein E gene requires c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase, and casein kinase 2. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26:1323–1329

Sladek FM (1994) Orphan receptor HNF-4 and liver-specific gene expression. Receptor 4:64

Small EM, Olson EN (2011) Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. Nature 469: 336–342

Smit M, van der Kooij-Meijs E, Frants RR, Havekes L, Klasen EC (1988) Apolipoprotein gene cluster on chromosome 19. Definite localization of the APOC2 gene and the polymorphic Hpa I site associated with type III hyperlipoproteinemia. Hum Genet 78:90–93

Smith JD, Melian A, Leff T, Breslow JL (1988) Expression of the human apolipoprotein E gene is regulated by multiple positive and negative elements. J Biol Chem 263:8300–8308

Song H, Saito K, Fujigaki S, Noma A, Ishiguro H, Nagatsu T et al (1998) IL-1 beta and TNF-alpha suppress apolipoprotein (apo) E secretion and apo A-I expression in HepG2 cells. Cytokine 10: 275–280

Sparrow CP, Baffic J, Lam MH, Lund EG, Adams AD, Fu X et al (2002) A potent synthetic LXR agonist is more effective than cholesterol loading at inducing ABCA1 mRNA and stimulating cholesterol efflux. J Biol Chem 277:10021–10027

Sporstol M, Mousavi SA, Eskild W, Roos N, Berg T (2007) ABCA1, ABCG1 and SR-BI: hormonal regulation in primary rat hepatocytes and human cell lines. BMC Mol Biol 8:5

Srivastava RA, Srivastava N, Averna M (2000) Dietary cholic acid lowers plasma levels of mouse and human apolipoprotein A-I primarily via a transcriptional mechanism. Eur J Biochem 267: 4272–4280

Staels B, Auwerx J (1998) Regulation of apo A-I gene expression by fibrates. Atherosclerosis 137(Suppl):S19–S23

Sticozzi C, Belmonte G, Pecorelli A, Cervellati F, Leoncini S, Signorini C et al (2013) Scavenger receptor B1 post-translational modifications in Rett syndrome. FEBS Lett 587:2199–2204

Sumi K, Tanaka T, Uchida A, Magoori K, Urashima Y, Ohashi R et al (2007) Cooperative interaction between hepatocyte nuclear factor 4 alpha and GATA transcription factors regulates ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8. Mol Cell Biol 27: 4248–4260

Sun Y, Wang N, Tall AR (1999) Regulation of adrenal scavenger receptor-BI expression by ACTH and cellular cholesterol pools. J Lipid Res 40:1799–1805

Sun D, Zhang J, Xie J, Wei W, Chen M, Zhao X (2012) MiR-26 controls LXR-dependent cholesterol efflux by targeting ABCA1 and ARL7. FEBS Lett 586:1472–1479

Suzuki S, Nishimaki-Mogami T, Tamehiro N, Inoue K, Arakawa R, Abe-Dohmae S et al (2004) Verapamil increases the apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol by induction of ABCA1 expression via Liver X receptor-independent mechanism. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24:519–525

Tall AR, Yvan-Charvet L, Terasaka N, Pagler T, Wang N (2008) HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. Cell Metab 7:365–375

Tamehiro N, Zhou S, Okuhira K, Benita Y, Brown CE, Zhuang DZ et al (2008) SPTLC1 binds ABCA1 to negatively regulate trafficking and cholesterol efflux activity of the transporter. Biochemistry 47:6138–6147

Tan CL, Plotkin JL, Veno MT, von Schimmelmann M, Feinberg P, Mann S et al (2013) MicroRNA-128 governs neuronal excitability and motor behavior in mice. Science 342: 1254–1258

Tang C, Vaughan AM, Oram JF (2004) Janus kinase 2 modulates the apolipoprotein interactions with ABCA1 required for removing cellular cholesterol. J Biol Chem 279:7622–7628

Tarling EJ, Edwards PA (2012) Dancing with the sterols: critical roles for ABCG1, ABCA1, miRNAs, and nuclear and cell surface receptors in controlling cellular sterol homeostasis. Biochim Biophys Acta 1821:386–395

Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I (2008) MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. Nature 455:1124–1128

Taylor AH, Wishart P, Lawless DE, Raymond J, Wong NC (1996) Identification of functional positive and negative thyroid hormone-responsive elements in the rat apolipoprotein AI promoter. Biochemistry 35:8281–8288

Thymiakou E, Zannis VI, Kardassis D (2007) Physical and functional interactions between liver X receptor/retinoid X receptor and Sp1 modulate the transcriptional induction of the human ATP binding cassette transporter A1 gene by oxysterols and retinoids. Biochemistry 46: 11473–11483

Towns R, Azhar S, Peegel H, Menon KM (2005) LH/hCG-stimulated androgen production and selective HDL-cholesterol transport are inhibited by a dominant-negative CREB construct in primary cultures of rat theca-interstitial cells. Endocrine 27:269–277

Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M et al (2011) MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. Nature 474:649–653

Truong TQ, Aubin D, Falstrault L, Brodeur MR, Brissette L (2010) SR-BI, CD36, and caveolin-1 contribute positively to cholesterol efflux in hepatic cells. Cell Biochem Funct 28:480–489

Trusca VG, Fuior EV, Florea IC, Kardassis D, Simionescu M, Gafencu AV (2011) Macrophage-specific up-regulation of apolipoprotein E gene expression by STAT1 is achieved via long range genomic interactions. J Biol Chem 286:13891–13904

Trusca VG, Florea IC, Kardassis D, Gafencu AV (2012) STAT1 interacts with RXRalpha to upregulate ApoCII gene expression in macrophages. PLoS ONE 7:e40463

Tu AY, Albers JJ (1999) DNA sequences responsible for reduced promoter activity of human phospholipid transfer protein by fibrate. Biochem Biophys Res Commun 264:802–807

Tu AY, Albers JJ (2001) Glucose regulates the transcription of human genes relevant to HDL metabolism: responsive elements for peroxisome proliferator-activated receptor are involved in the regulation of phospholipid transfer protein. Diabetes 50:1851–1856

Tzameli I, Zannis VI (1996) Binding specificity and modulation of the ApoA-I promoter activity by homo- and heterodimers of nuclear receptors. J Biol Chem 271:8402–8415

Uehara Y, Engel T, Li Z, Goepfert C, Rust S, Zhou X et al (2002) Polyunsaturated fatty acids and acetoacetate downregulate the expression of the ATP-binding cassette transporter A1. Diabetes 51:2922–2928

Uehara Y, Miura S, von Eckardstein A, Abe S, Fujii A, Matsuo Y et al (2007) Unsaturated fatty acids suppress the expression of the ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) and ABCA1 genes via an LXR/RXR responsive element. Atherosclerosis 191:11–21

Urizar NL, Dowhan DH, Moore DD (2000) The farnesoid X-activated receptor mediates bile acid activation of phospholipid transfer protein gene expression. J Biol Chem 275:39313–39317
Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol 9:654–659
Valenta DT, Bulgrien JJ, Banka CL, Curtiss LK (2006) Overexpression of human ApoAI transgene provides long-term atheroprotection in LDL receptor-deficient mice. Atherosclerosis 189: 255–263
Van Eck M, Herijgers N, Yates J, Pearce NJ, Hoogerbrugge PM, Groot PH et al (1997) Bone marrow transplantation in apolipoprotein E-deficient mice. Effect of ApoE gene dosage on serum lipid concentrations, (beta)VLDL catabolism, and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17:3117–3126
Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. Science 318:1931–1934
Vaziri ND, Sato T, Liang K (2003) Molecular mechanisms of altered cholesterol metabolism in rats with spontaneous focal glomerulosclerosis. Kidney Int 63:1756–1763
Vaziri ND, Gollapudi P, Han S, Farahmand G, Yuan J, Rahimi A et al (2011) Nephrotic syndrome causes upregulation of HDL endocytic receptor and PDZK-1-dependent downregulation of HDL docking receptor. Nephrol Dial Transplant 26:3118–3123
Venteclef N, Haroniti A, Tousaint JJ, Talianidis I, Delerive P (2008) Regulation of anti-atherogenic apolipoprotein M gene expression by the orphan nuclear receptor LRH-1. J Biol Chem 283:3694–3701
Vickers KC, Rader DJ (2013) Nuclear receptors and microRNA-144 coordinately regulate cholesterol efflux. Circ Res 112:1529–1531
Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. Nat Cell Biol 13:423–433
von Eckardstein A (1996) Cholesterol efflux from macrophages and other cells. Curr Opin Lipidol 7:308–319
von Eckardstein A, Hersberger M, Rohrer L (2005) Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 8:147–152
Vu-Dac N, Schoonjans K, Laine B, Fruchart JC, Auwerx J, Staels B (1994) Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. J Biol Chem 269: 31012–31018
Wagner J, Riwanto M, Besler C, Knau A, Fichtlscherer S, Roxe T et al (2013) Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. Arterioscler Thromb Vasc Biol 33:1392–1400
Walsh A, Ito Y, Breslow JL (1989) High levels of human apolipoprotein A-I in transgenic mice result in increased plasma levels of small high density lipoprotein (HDL) particles comparable to human HDL3. J Biol Chem 264:6488–6494
Wan YJ, An D, Cai Y, Repa JJ, Hung-Po Chen T, Flores M et al (2000) Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor alpha as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver. Mol Cell Biol 20:4436–4444
Wang Y, Oram JF (2002) Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. J Biol Chem 277:5692–5697
Wang Y, Oram JF (2007) Unsaturated fatty acids phosphorylate and destabilize ABCA1 through a protein kinase C delta pathway. J Lipid Res 48:1062–1068
Wang XQ, Panousis CG, Alfaro ML, Evans GF, Zuckerman SH (2002) Interferon-gamma-mediated downregulation of cholesterol efflux and ABC1 expression is by the Stat1 pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol 22:e5–e9

Wang N, Chen W, Linsel-Nitschke P, Martinez LO, Agerholm-Larsen B, Silver DL et al (2003) A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I. J Clin Invest 111:99–107

Wang JH, Keisala T, Solakivi T, Minasyan A, Kalueff AV, Tuohimaa P (2009) Serum cholesterol and expression of ApoAI, LXRbeta and SREBP2 in vitamin D receptor knock-out mice. J Steroid Biochem Mol Biol 113:222–226

Wang D, Xia M, Yan X, Li D, Wang L, Xu Y et al (2012a) Gut microbiota metabolism of anthocyanin promotes reverse cholesterol transport in mice via repressing miRNA-10b. Circ Res 111:967–981

Wang K, Li H, Yuan Y, Etheridge A, Zhou Y, Huang D et al (2012b) The complex exogenous RNA spectra in human plasma: an interface with human gut biota? PLoS ONE 7:e51009

Wang L, Jia XJ, Jiang HJ, Du Y, Yang F, Si SY et al (2013a) MicroRNAs 185, 96, and 223 repress selective high-density lipoprotein cholesterol uptake through posttranscriptional inhibition. Mol Cell Biol 33:1956–1964

Wang M, Wang D, Zhang Y, Wang X, Liu Y, Xia M (2013b) Adiponectin increases macrophages cholesterol efflux and suppresses foam cell formation in patients with type 2 diabetes mellitus. Atherosclerosis 229:62–70

Wang W, Song W, Wang Y, Chen L, Yan X (2013c) HMG-CoA reductase inhibitors, simvastatin and atorvastatin, downregulate ABCG1-mediated cholesterol efflux in human macrophages. J Cardiovasc Pharmacol 62:90–98

Wehmeier K, Beers A, Haas MJ, Wong NC, Steinmeyer A, Zugel U et al (2005) Inhibition of apolipoprotein AI gene expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D3. Biochim Biophys Acta 1737:16–26

Wei Z, Huang D, Gao F, Chang WH, An W, Coetzee GA et al (2013) Biological implications and regulatory mechanisms of long-range chromosomal interactions. J Biol Chem 288: 22369–22377

Wellington CL, Walker EK, Suarez A, Kwok A, Bissada N, Singaraja R et al (2002) ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. Lab Invest 82:273–283

Werb Z, Chin JR (1983a) Apoprotein E is synthesized and secreted by resident and thioglycollate-elicited macrophages but not by pyran copolymer- or bacillus Calmette-Guerin-activated macrophages. J Exp Med 158:1272–1293

Werb Z, Chin JR (1983b) Endotoxin suppresses expression of apoprotein E by mouse macrophages in vivo and in culture. A biochemical and genetic study. J Biol Chem 258: 10642–10648

Werb Z, Chin JR (1983c) Onset of apoprotein E secretion during differentiation of mouse bone marrow-derived mononuclear phagocytes. J Cell Biol 97:1113–1118

Westerterp M, Murphy AJ, Wang M, Pagler TA, Vengrenyuk Y, Kappus MS et al (2013) Deficiency of ATP-binding cassette transporters A1 and G1 in macrophages increases inflammation and accelerates atherosclerosis in mice. Circ Res 112:1456–1465

Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell 75:855–862

Wolfrum C, Poy MN, Stoffel M (2005) Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis. Nat Med 11:418–422

Wolfrum C, Howell JJ, Ndungo E, Stoffel M (2008) Foxa2 activity increases plasma high density lipoprotein levels by regulating apolipoprotein M. J Biol Chem 283:16940–16949

Wood P, Mulay V, Darabi M, Chan KC, Heeren J, Pol A et al (2011) Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling modulates protein stability and cell surface expression of scavenger receptor SR-BI. J Biol Chem 286:23077–23092

Xu N, Ahren B, Jiang J, Nilsson-Ehle P (2006) Down-regulation of apolipoprotein M expression is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase in HepG2 cells. Biochim Biophys Acta 1761: 256–260

Yang XP, Freeman LA, Knapper CL, Amar MJ, Remaley A, Brewer HB Jr et al (2002) The E-box motif in the proximal ABCA1 promoter mediates transcriptional repression of the ABCA1 gene. J Lipid Res 43:297–306

Yang C, McDonald JG, Patel A, Zhang Y, Umetani M, Xu F et al (2006) Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. J Biol Chem 281:27816–27826

Yang Y, Zhang Z, Jiang W, Gao L, Zhao G, Zheng Z et al (2007) Identification of novel human high-density lipoprotein receptor Up-regulators using a cell-based high-throughput screening assay. J Biomol Screen 12:211–219

Yang Y, Jiang W, Wang L, Zhang ZB, Si SY, Hong B (2009) Characterization of the isoflavone pratensein as a novel transcriptional up-regulator of scavenger receptor class B type I in HepG2 cells. Biol Pharm Bull 32:1289–1294

Yang T, Chen C, Zhang B, Huang H, Wu G, Wen J et al (2010) Induction of Kruppel-like factor 4 by high-density lipoproteins promotes the expression of scavenger receptor class B type I. FEBS J 277:3780–3788

Yang JS, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC et al (2011) Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. RNA 17:312–326

Yokoyama S, Arakawa R, Wu CA, Iwamoto N, Lu R, Tsujita M et al (2012) Calpain-mediated ABCA1 degradation: post-translational regulation of ABCA1 for HDL biogenesis. Biochim Biophys Acta 1821:547–551

Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M, Yahagi N, Hasty AH, Matsuzaka T et al (2001) Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. Mol Cell Biol 21:2991–3000

Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC et al (2002a) Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. Proc Natl Acad Sci USA 99:16237–16242

Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC et al (2002b) Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. J Clin Invest 110:671–680

Yu XH, Jiang HL, Chen WJ, Yin K, Zhao GJ, Mo ZC et al (2012) Interleukin-18 and interleukin-12 together downregulate ATP-binding cassette transporter A1 expression through the interleukin-18R/nuclear factor-kappaB signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells. Circ J 76:1780–1791

Yu XH, Qian K, Jiang N, Zheng XL, Cayabyab FS, Tang CK (2014) ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. Clin Chim Acta 428:82–88

Zaiou M, Azrolan N, Hayek T, Wang H, Wu L, Haghpassand M et al (1998) The full induction of human apoprotein A-I gene expression by the experimental nephrotic syndrome in transgenic mice depends on cis-acting elements in the proximal 256 base-pair promoter region and the trans-acting factor early growth response factor 1. J Clin Invest 101:1699–1707

Zannis VI, Cole FS, Jackson CL, Kurnit DM, Karathanasis SK (1985) Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and E mRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocyte-macrophages. Biochemistry 24: 4450–4455

Zannis VI, Kan HY, Kritis A, Zanni E, Kardassis D (2001a) Transcriptional regulation of the human apolipoprotein genes. Front Biosci 6:D456–D504

Zannis VI, Kan HY, Kritis A, Zanni EE, Kardassis D (2001b) Transcriptional regulatory mechanisms of the human apolipoprotein genes in vitro and in vivo. Curr Opin Lipidol 12: 181–207

Zhang X, Jiang B, Luo G, Nilsson-Ehle P, Xu N (2007) Hyperglycemia down-regulates apolipoprotein M expression in vivo and in vitro. Biochim Biophys Acta 1771:879–882

Zhang Y, Shen C, Ai D, Xie X, Zhu Y (2011) Upregulation of scavenger receptor B1 by hepatic nuclear factor 4alpha through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanism in liver. PPAR Res 2011:164925

Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y et al (2012) Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. Cell Res 22:107–126

Zhao GJ, Tang SL, Lv YC, Ouyang XP, He PP, Yao F et al (2013) Antagonism of betulinic acid on LPS-mediated inhibition of ABCA1 and cholesterol efflux through inhibiting nuclear factor-kappaB signaling pathway and miR-33 expression. PLoS ONE 8:e74782

Zuckerman SH, Evans GF, O'Neal L (1993) Exogenous glucocorticoids increase macrophage secretion of apo E by cholesterol-independent pathways. Atherosclerosis 103:43–54

IBPC

NICOLAE SIMIONESCU

HISTORY and MEMORY

[ISTORIE SI MEMORIE]

CUPRINS

I. Geneza și evoluția Institutului de Biologie și Patologie Celulară « Nicolae Simionescu » (IBPC-NS)

8 / • 1970- 1979 Rădăcinile institutului: Universitatea Rockefeller - apare o idee îndrăzneaţă

14/ • 1979- 1989 Un Vis a devenit Realitate / dar... se prefaţează dificultăţile...

17 / • 1990 Institutul este afliat la Academia Română

18 / • 1995 Nicolae Simionescu părăsește lumea noastra, dar spiritul său ramâne in Institut, pretutindeni. În memoria lui, Institutul este numit IBPC "Nicolae Simionescu".

19 / • 2000 Institutul câștigă prin competiţie titlul de Centru de Excelenţă al Comunităţii Europene

20/ • 2009- 2012 Proiectul "CARDIOPRO" Re-intinerirea Institutului în formă și fond / introducerea de noi tehnologii / modernizarea proiectelor de cercetare

21 / • 2019 După 40 de ani de la înființare

II. Devenirea IBPC în imagini și cuvinte

1970- 1979

44 / • Rădăcinile IBPC: Universitatea Rockefeller și Universitatea Yale, SUA

1979- 1989

49 / • Deschiderea oficială a IBPC; Simpozionul inaugural, Septembrie 1979

50 / • Mesajele Prof. George Palade si Prof. Christian de Duve, Laureaţi ai Premiului Nobel, la inaugurare

51 / • Mesaje de la Mari Profesori Români despre IBPC

54 / • Finantarea IBPC intre 1980 – 1995

55 / • Înființarea și Primul Congres anual al Societăţii Române de Biologie Celulară, București, Iulie 1982

60 / • Crăciunul, Ziua Femeii (8 martie), Ziua Bărbatului (8 aprilie) - Sărbători nelipsite în Institut

68 / • A 10-a Aniversare a IBPC - Mesajele Profesorilor Americani cu ocazia Simpozionului România - SUA, Septembrie 1989
72 / • 1989 Comemorarea în IBPC a 100 de ani de la dispariţia lui Mihai Eminescu

1990- 1995

74 / • IBPC şi Academia Română
76 / • 1995 Acad. Nicolae Simionescu părăsește această lume - mesaje
81 / • 1995 Acad. Maya Simionescu devine Director al IBPC-NS

1996- 2008

81 / • Acad. Maya Simionescu aleasă Vice-preşedinte al Academiei Române (1998-2006)
87 / • 1999 Simpozion la cea de-a 20-a aniversare a IBPC-NS - mesaje
96 / • 2000 IBPC "Nicolae Simionescu" selectat prin competiţie Centrul de Excelenţă al Comunităţii Europene
97/ • Cursuri Postuniversitare de Perfectionare (2000-2008)
104 / • 2004 Simpozionul aniversar 25 de ani de IBPC-NS - mesaje
127 / • 2005 IBPC-NS câştigă prin competiţie un grant important de la Comunitatea Europeană: Proiectul SERA (2005 – 2008)

2009 - 2019

132 / • 2009 Simpozion aniversar IBPC-NS "30 de ani pe drumul de la biologia celulară la medicina moleculară"
136 / • 2009 - 2012 Grant CARDIOPRO câştigat prin competiţie din Fonduri Structurale Europene
147 / • 2014 Aniversare IBPC-NS la 35 de ani de activitate
152 / • 2015 In Memoriam Prof. Nicolae Simionescu
156 / • 2017 Simpozion Aniversar "Universul din Celulă" – cu ocazia zilei de naştere a Acad. Maya Simionescu
176 / • 2018 A 12-a Conferinţă de Proteomică a Europei Centrale şi de Est
179 / • 2016- 2020 Granturi câştigate prin competiţie din Fonduri Structurale Europene şi UEFISCDI
185 / • 2019 IBPC-NS Amintiri la 40 de ani

O scurtă incursiune neromanțată în „Istoria și Memoria”
Institutului nostru dedicată iluștrilor mei mentori,
Prof. Nicolae Simionescu și Prof. George Palade

Geneza și evoluția Institutului de Biologie și Patologie Celulară « Nicolae Simionescu »

Celula este o Taină. Dintotdeauna și mereu, Omul a încercat să dezlege tainele vieții. Cu mijloace simple la început, cu tehnologie complexă azi, a fost acceptată ideea că Celula ascunde în ea secretul vieții, al bolii, al morții. Să o înțelegi, să o cunoști este visul Omului de sute de ani.

Îndrăzneții, vizionarii și experimentaliștii ne-au dezvăluit portretul unei celule: o mică creatură independentă capabilă să trăiască, să funcționeze, să se înmulțească. Ea îndeplinește funcții multiple. Dar, funcția aduce cu ea și disfuncția. De ce? Cum? În ce fel?

În această căutare, alături de mulți cercetători din lume, ne-am îmbarcat și noi, aici acasă; la început am fost doi, ni s-au alăturat alți căutători ca apoi să ajungem azi, la o echipa – o mică armată care încearcă să deslușească „tainele Celulei".

Cred în puterea Instituției. Mica noastră armată de căutători s-a adunat în ceea ce este azi Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu" (IBPC-NS).
Incercand să periodizez geneza și dezvoltarea Institutului nostru observ că:

- între anii 1970 – 1979 a fost perioada americană, în care a apărut ideea, care părea un vis frumos, aproape imposibil, perioada în care visul a căpătat încet contur ca apoi să se materializeze într-o clădire cu 5 etaje , împodobită cu aparate și mai ales tineri. O mare speranță;
- între 1979-1989 a fost perioadă în care ne-am început activitatea și am trecut de la Vis la Realitatea de acasă pentru ca
- după 1989 – să trecem la ...o nouă Realitate.

Iată o scurtă istorisire a unei povești pe care George Palade a denumit-o **"experimentul Simionescu".**

1970 – 1979
Rădăcinile institutului: Universitatea Rockefeller
- apare o idee îndrăzneață -

23 iulie 1970. Una din cele mai fericite zile din viața mea. După 6 luni de așteptare, după un răspuns negativ, după nenumărate insistențe ale Prof. Palade, în 23 Iulie mi se aprobă pașaportul pentru plecarea în SUA.

Am plecat în 25 iulie. În avion revedeam acea zi din 1969 când Profesorul Palade într-o vizită la diferite Institute din România, poposește și la noi, la Institutul de Endocrinologie unde făceam cercetare sub îndrumarea atentă a unui foarte exigent mentor, Prof. Nicolae Simionescu. Îi arătăm proiectele noastre, ce și cum lucram și ce am obținut. El vorbește puțin, ne întreabă câți oameni lucrează cu noi, ii spunem noi doi și două tehniciene bune și apoi, pleacă. După mai puțin de un an primim o invitație care ni se părea că a venit de la Tutankamon. Profesorul George Palade invită pe Nicolae Simionescu și pe mine să lucrăm cu el la Rockefeller“ un an, poate doi”. Cu unele dificultăți Nicolae Simionescu pleacă pe 1 februarie 1970. Mie nu mi se dă drumul. Soț-soție plecați ....era periculos...
Nu îmi amintesc multe despre drumul către New York. Știu doar că am aterizat pe aeroportul Kennedy și a doua zi lucram deja în laborator.

Profesorii mei mi-au explicat proiectul la care lucram. Aveam un entuziasm nemărginit. Lucram ușor 14 ore pe zi. Am început bine, primele imagini pe care le-am făcut la microscopul electronic – au fost exact ce căutam și au devenit dovezile de care ipoteza noastră avea nevoie. »Norocul începătorului ».

Universitatea Rockefeller e un spațiu intelectual deosebit, ca cercetător nu îți poți dori altceva. Contactul cu viața științifică și cultura americană, marcați de personalitatea prof. Palade, de atmosfera de știință adevărată a fost pentri noi un șoc și o provocare. A apărut un gând; hai să încercăm (1) să creăm acasă o oază de știință adevărată în care tinerii cercetători din România si cu noi să-și desfășoare talentul, imaginația și capacitățile creatoare și (2) să aducem biologia celulară în țară, această nouă știință care simțeam că va revoluționa toate științele vieții, și nu numai, Filosofic gândind – cred că Institutul trebuia să apară. Era momentul istoric pentru această nouă știință și, ea trebuia să ajungă și în România….

1971 -1972 Începem să gândim serios la ceea ce părea aproape “imposibil”. Facem prima schiță a viitorului Institut. Începem formalitățile.
Nicolae Simionescu, într-un interviu acordat lui Nicolae Tone, își amintește acea perioadă astfel: ...."*Şi, la un moment dat, în 1972, într-o suită de împrejurări care sunt foarte amuzante, m-am aşezat, împreună cu Maya, în faţa unei hârtii de împachetat şi am spus, şi unul şi altul, în acelaşi timp: «Hai să facem (în România) un centru modern de biologie celulară, să adunăm nişte tineri în jurul nostru, să-i formăm ca un fel de familie şi să asigurăm, astfel, o oază de*

muncă, de linişte şi de seriozitate»".

În acest răstimp, studiile noastre și colaborarea cu Prof. Palade se desfășoară foarte bine. Rezultatele obținute și prezentate la diverse congrese (1979-1989) au făcut ca „de la un an poate doi" colaborarea noastră să se întindă peste 10 ani; mai mult, între timp am devenit pentru americani „the famous Romanian trio".

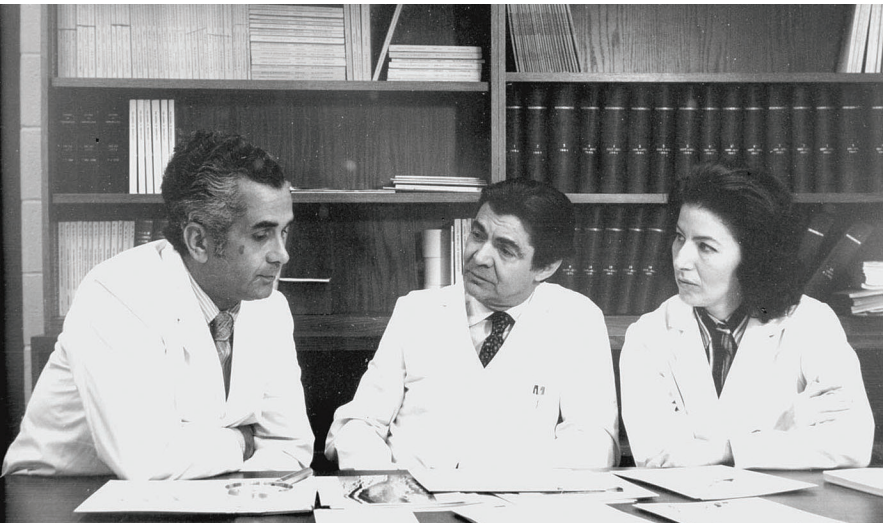
A fost perioada în care ziua lucram cu sârg iar seara /noaptea visam. Profesorul Palade descrie cel mai bine această perioadă:

"Printre experimente, descoperiri, selectări de microfotografii și redactări de manuscrise, Nicolae și Maya Simionescu au început să lucreze la planurile unui proiect ambițios: un nou laborator care urma să fie construit în București.

Inițiativa le-a aparținut în întregime.

Rolul meu în acest nou proiect a fost de a găsi, împreuna cu ei, căile și mecanismele care să asigure viabilitatea acestui institut în România."

Începem numeroasele pregătiri, trecem prin toate formalitățile, învingem birocrația si mai ales convingem autoritățile acelor timpuri de nevoia și importanța noului Institut.



Nu cred că am fi reușit fără intervențiile și sprijinul permanent al Profesorului Palade, al ambasadorului nostru în SUA, Corneliu Bogdan și al prietenului nostru și al Prof. Palade, marele chirurg, Theodor Burghelea, Ministrul Sănătății în acel timp. Legat de hotărârea noastră, Nicolae Simionescu îi spune într-un interviu lui Nicolae Tone „Nu puteam schimba regimul – dar credeam că putem schimba ceva în viața tinerilor români inteligenți și înzestrați și puteam returna șansa pe care am avut-o de a lucra cu George Palade în SUA (la Rockefeller si la Yale).

Anul 1973. Primim aprobarea de înființare a Institutului dorit. Nicolae Simionescu pleacă rapid la București – alege ca amplasament pentru noul Institut, un teren în strada B.P.Hașdeu nr 8, pentru că era viran și pentru că era în apropierea altor centre Universitare (Facultățile de Biologie, Chimie, Medicină, Veterinară, Institutele Cantacuzino și Babeș).

Imediat am început schițarea planurilor arhitecturale ale Institutului. Aveam experiența mutării și amenajării noului departament de Biologie Celulară de la Universitatea Yale, unde prof. Palade împreună cu unii colaboratori (inclusiv noi) s-a mutat. Fiecare moment liber, în special seara, l-am folosit pentru a schița tot ce urma să se petreacă în fiecare cameră din 5 etaje ale noului Institut. Arhitecților români le-a plăcut planul și l-au preluat fără obiecții.

1974 Începe construcția. Începe construcția. Nicolae Simionescu vine la București să bată țărușii care marcau perimetrul viitorului Institut. Pune unul sau doi dolari la temelia clădirii pentru a aduce bogăție. Un lucrător i-a spus: „Domnule Profesor, nu puneți un dolar în pământ – în viitor, autoritățile s-ar putea să dărâme clădirea ca să ia dolarul"
Pentru a urmări construcția, venim la București odată sau de două ori în fiecare an.
Stabilim programul de cercetare al noului Institut și considerăm că pe viitor, acasă, trebuie să trecem de la biologie celulară la patologie celulară (patologia era iubirea ascunsă a lui Nicolae Simionescu) și să ne concentrăm eforturile pe o problemă majoră a Societății moderne și cauza principală de mortalitate în țările dezvoltate, inclusiv România, Biopatologia Celulară și Farmacologia Celulară a bolilor sistemul cardiovascular (Ateroscleroză, Diabet, etc). Atunci, ca și acum, se pare că la fiecare 10 minute un om moare de boala cardiovasculară.

Acuarelă de arh. Gh. Leahu

Era și este, o provocare științifică serioasă și socio-economic importantă. Ne propuneam să înțelegem boala cardiovasculară, să o stăpânim, pentru ca apoi a o putea tămădui. Plan ambițios, o boală ucigașă la care lucrau sute de cercetători din lume.
Și mai mult decât atât.

Istoria Europei inclusiv a noastră a pătimit enorm din cauza faptului că multe hotărâri decisive au fost luate de oameni afectați de boli cardiovasculare. La conferința de la Yalta din februarie 1945 soarta noastră a fost hotărâtă de trei oameni toți având boala coronariană avansată: Roosvelt, care moare în aprilie 1945, Stalin în 1955 și Churchill în 1965 de accident vascular.

Credo-ul cercetărilor noastre care a devenit și al Institutului a fost:
"Biologia Celulară și Moleculară în Slujba Sănătății Omului"

Devenisem destul de cunoscuți, iar relațiile cu cercetătorii din laboratoare de prestigiu din SUA ne-au ajutat să obținem locuri pentru stagii de specializare și 13 burse Fullbright de un an pentru tineri cercetători din București. Astfel în câteva dintre aceste vizite, am intervievat absolvenți de la facultățile de Chimie, Biochimie, Biologie, Biofizică, Medicină, etc) , și am ales 13 tineri pe care i-am trimis la specializare în cele mai bune laboratoare în domeniul biomedical din SUA.

Comandăm toate echipamentele necesare cercetării de biologie celulară și, ca să evităm izolarea, ne asiguram că vom avea o bibliotecă cu circa 25 de abonamente la principalele reviste internaționale de știință. Cu o întrerupere de un an, din cauza cutremurului răvășitor din 1977, clădirea este terminată în 1979.

Prof. Palade are o idee importantă (ca de obicei): pentru a se evita izolarea noastră în România. Să nu plecăm acasă până nu se semnează un Acord între Universitatea Yale și Ministerul Educației din Romania în care să se specifice obligația ca noi doi să venim 3 luni pe an la Univ. Yale pentru a participa la Cursurile de Biologie Celulară și să ne continuăm colaborarea. Acordul a fost semnat pentru 6 ani. A mers cu mici dificultăți timp de 6 ani, apoi cu mari dificultăți.

Astfel, între 1970-79 Institutul nostru, pornit de la primele planuri făcute de noi pe hârtie de împachetat, la alegerea terenului viran din București, la finalizarea construcției, ajunge împodobit cu aparatură modernă, cu tineri cercetători aleși cu grijă din România și cu doi seniori, să fie gata de lucru.

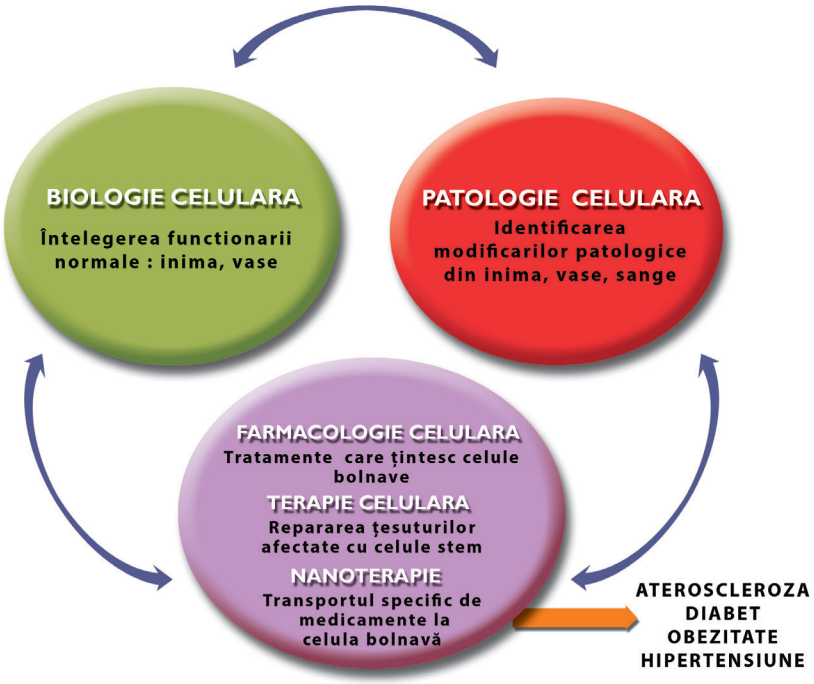
Pentru Institut am intervievat 1200 de oameni și am ales 80 sau 100 (de la portar la cercetător).

Ne pregătim de inaugurare. Semne rele au început să apăra. Trei zile înainte de inaugurare suntem anunțați oficial de Ministerul Educației că nu avem dreptul să organizăm simpozionul și nici Ministerul nu va plăti transportul cu Tarom al oaspeților. Eram disperați, unii dintre invitații noștri erau deja pe drum, prin Europa. În Institut se caută posibilități de rezolvare. Profesorul Nicolae Simionescu oferă sa dea Ministerului noua noastră mașină (Peugeot) pentru a acoperi cheltuielile. În aceeași după-amiază, tinerii din institut s-au oferit să-și doneze salariile pe o luna sau două în același scop. După 3 zile, un "înger protector" a intervenit și a făcut posibilă susținerea Simpozionului. Nici azi nu știu de unde a venit rezolvarea si cine a fost protectorul nostru.

3 septembrie 1979 - IBPC este inaugurat oficial cu un simpozion Româno-American intitulat: *"Transportul macromoleculelor în sistemele celulare". Au participat din SUA, profesorii George Palade, Christian de Duve și Gunter Blobel, laureați ai Premiului Nobel, precum și profesorii Marilyn Farquhar, David Sabatini și din Germania, profesorul Werner Franke.*

1979- 1989
Un Vis a devenit Realitate / dar... se prefațează dificultățile...
« Omului îi trebuie un vis ca să suporte realitatea » (S. Freud)

Am început cu mare entuziasm proiectele a căror succesiune în viziunea noastră arătau schematic ca mai jos.



Filosofia noastră de baza a constat în parcurgerea succesivă sau concomitentă a cercetărilor privind funcționarea normală a inimii și vaselor de sânge (Biologie Celulară) urmată de identificarea alterărilor care au loc în diferitele segmente vasculare (patologie celulară) pentru a ajunge la ținta finală de încetinire sau eradicare a evoluției bolilor sistemului cardiovascular și a complicațiilor lor (Farmacologia Celulară, Terapia Celulară).

Realizăm cu toții că bolile inimii sunt un subiect capital în viața individului și că dacă le vom desluși, noi sau alții, va fi „un pas mic pentru noi dar un pas mare pentru omenire". În plus, era și ceva romantic în cercetarea noastră - ne aplecam asupra inimii, care, cum spune poetul

"Inima, prin bătăile ei, aplaudă existența noastră" (Lucian Blaga).

Curând, au început sa apară primele rezultate – promițătoare.

S-a creat o stare deosebita în Institut. Opream la poarta institutului tot ceea ce se întâmpla în afara lui și măcar în cele 10-12 ore cât stăteam la lucru să uităm de sistemul

opresiv și greutățile prin care eram nevoiți să trecem. Mai mult, in Institut se trăia ca într-o familie. La sala de mese, două minunate doamne ne pregăteau în fiecare zi o ciorba bună și chemau tinerii la masă. Tot în sala de mese, se cânta în timpul prânzului muzica simfonică și pe masa existau folii cu viața compozitorului respectiv. Am reușit să închiriem de două ori pe săptămână un teren de tenis de la BNR unde împreună cu mulți tineri din Institut jucam tenis. Am serbat în fiecare an Crăciunul și Moș Crăciun venea cu daruri pentru copii – copiilor noștri. Am făcut toate acestea deoarece aveam credința că:

Un institut este o Școală
Un institut este o Casă
Un institut este o Familie
Cercetarea este un Mod de Viață

Și astăzi cred că un institut de cercetare trebuie să fie o școală în care nu se dau lecții de la pupitru, dar se dau exemple. Într-un institut de cercetare adevărata se crează o "stare de grație" care cuprinde în ea curiozitate, onestitate, rezistență la speculații și aproximații – respect față de adevărul științific – o stare de corectă comunicare, toate având un scop comun : știință adevărată – știință care avansează Știința și Cunoașterea. Să accepți și să transmiți că ***adevărul este ceea ce trece testul experienței*** (A. Einstein).

Bucuria noastră nu a durat mult; ea prefața necazurile care urmau să vina. La începutul anului **1980** am fost înștiințați că toate fondurile noastre de cercetare au fost tăiate. Nu fonduri de chimicale, de materiale, nici un abonament la bibliotecă, nimic, nimic.
Puținele fonduri pe care le aveam erau pentru micile noastre salarii și cheltuielile de întreținere a casei.

Disperarea era mare. Trebuia să găsim o ieșire, o soluție. Sir Medawar spune ca ***Știința este arta de a găsi soluții***. Și le-am găsit.

În anii 1980, singura instituție care oferea, prin competiție, fonduri de cercetare în afara granițelor țării era Institutul Național de Sănătate (NIH) din SUA. Facem imediat o primă aplicație de grant, competiționăm cu toți aplicanții americani și câștigăm in 1981, primul grant pentru 3 ani. Chiar înainte de terminarea acestuia, facem o aplicație pentru un nou Grant competitiv și datorită rezultatelor obținute anterior, am câștigat al 2-lea Grant și apoi bazat tot pe rezultate am obținut al 3-lea Grant. În 1990, au apărut alt sistem de granturi americane, FIRCA (Fogarty International Research Collaborative Award) la NIH. Am aplicat și am câștigat două grant-uri în colaborare cu Prof. Samuel Silverstein și Prof. David Stern de la Universitatea Columbia din New York (unde eram și „visiting profesori"). În felul acesta toată cercetarea institutului între 1979-1995 a fost subvenționată de Granturile NIH - SUA.

Între anii 1979-1989, viabilitatea, evitarea izolării și supraviețuirea Institutului în condițiile vitrege ale comunismului a fost posibilă , în principal prin voința comună a grupului nostru de „a bate sistemul" . În plus, la inițiativa înțeleaptă a Profesorului Palade, împreună cu Nicolae Simionescu am fost numiți profesori vizitatori la Universitatea Yale,

New Haven, fiind implicați anual timp de 3 luni în activități de predare și cercetare. Această asociere ne-a facilitat continuarea legăturilor privilegiate cu universități din SUA și specialiști remarcabili în domeniu, noi schimburi științifice și evitarea izolării, precum și obținerea de burse pentru cercetătorii IBPC. În acești ani, 15 tineri cercetători din institut au fost instruiți în prestigioase universități americane. In plus, in Institut au avut loc 5 simpozioane româno-americane subvenționate de NIH-SUA care au fost vitale pentru evitarea izolarii si menținerea cercetărilor moderne.

În acea istorie rea, cercetarea a fost salvarea noastră. Am dovedit că regimul nu poate cotropi Țara Științei – acolo mintea noastră era liberă și gândirea fără limite.... singurele limite erau propriile noastre limite.

Am câștigat "pariul" cu istoria! Nu am avut niciodată vocația de a ne resemna ...Greșesc rău cei care spun că în perioada comunismului Romania a fost o "Siberie a spiritului". Scriitorii au scris, cercetatorii au cercetat…Pentru că nici un regim, nu iți poate cotropi spiritul. În acea perioadă dramatică, istoric și social – tocmai pentru că era greu și aproape imposibil după unii – am reușit ca în oaza noastră să ne desfășurăm – cât am putut – ideile – dorințele – și să menținem aprinsă palida luminiță a cercetării românești. Eram ca în povestea « fetiței cu chibrituri », țineam permanent chibritul aprins (la noi în Institut, veioza) și făceam cercetare cât puteam noi mai bine. De aceea , după doar 10 ani de la apariție, Institutul nostru și-a căpătat un loc bun între Institutele Europene.

Așa cum am spus mai sus, în institut eram uniți de o dorință comună : "să batem sistemul" făcând cercetare bună. Era modul nostru de a rezista într-o perioadă infernală. A fost modul nostru de a trece cu capul sus – printr-o perioadă care te putea ușor încovoia. Abia acum îmi dau seama ce noroc am avut cu profesiunea noastră.

În septembrie 1989 a venit la noi un prieten care lucra la Ministerul Educației și Cercetării, care confidențial, în curtea institutului, ne-a spus ca suntem pe „lista neagra" și să ne pregătim să răspundem la 3 acuzații grave care erau pe masa "tovarășei": 1. Vindem secretele noastre americanilor; 2. publicăm doar în reviste străine, nu românești si 3. planul nostru de cercetare nu a fost aprobat de Cabinetul 2 (asta era adevărat, nici nu consideram că trebuie). Restul inepții!!!!!

Spre șansa noastră a venit anul "1989". În acel moment am știut că am învins scepticii care nu credeau în reușita si rezistența noastră și am știut că:

am câștigat "pariul" cu istoria!

A venit Libertatea ! Am înțeles repede că la început democrația este timidă și libertatea fragilă: un cal liber e frumos, un tigru liber este periculos.

Acum ne puteam desfășura deplin pentru că știm bine că **cercetarea înseamna deopotrivă libertate și responsabilitate**

1989 - 1990 - Căderea comunismului a adus unele schimbări în structura institutului.

- IBPC a fost afiliat la Academia Română.
- Doar după 10 ani de activitate, de la un grup necunoscut IBPC a devenit instituție membră a rețelei globale UNESCO - MCBN (Rețeaua de Biologie Moleculară și Celulară).
- Un număr din cercetătorii noștri au dorit să experimenteze viața științifică din Europa și Statele Unite. Șansa echipei noastre a fost ca în locul lor ni s-au alăturat tineri cu talent si dorința pentru cercetare, astfel că schimbarea nu a afectat performanța noastră în cercetare.

1992 - Pe baza rezultatelor am câștigat două granturi de colaborare FIRCA-NIH-SUA (3 ani fiecare) cu Prof. Samuel Silverstein și Prof. David Stern de la Universitatea Columbia, New York, SUA. În plus am mai avut fonduri pentru colaborări în cadrul Comunității Europene și am câștigat un Grant de la Swiss National Science Foundation pentru un proiect de colaborare. (1997) Acesta a fost semnul că lucrăm la ceva important și că rezultatele noastre sunt valabile, acceptate și apreciate.

Institutul și învățământul de Biologie Celulară Pregătirea viitoarelor generații

Încă de la început, ne-am propus patru obiective mari: 1. Cercetare biomedicală, 2. răspândirea Biologiei Celulare în toate centrele universitare din țară; 3 pregătirea noilor generații de cercetători, și 4. facilitarea schimburilor internaționale.

De la înființare, din 1979, **laboratoarele Institutului au fost deschise** (ca și bibliotecă) pentru oricine dorea să învețe tehnici sau metode de cercetare. Foarte mulți cercetători din țară au trecut pragul Institutului să învețe tainele biologiei celulare.

După nici 3 ani de la înființare, în 1982 la inițiativa Prof. Nicolae Simionescu și împreună cu profesori din toate orașele universitare ale țării am fondat **Societatea Română de Biologie Celulară.** Ea a devenit in timp, o societate trofică, foarte activă, azi compusă din aproximativ 450 de membri din întreaga țară. De la înființare, societatea organizează un congres anual în care noutățile din cercetarea de biologie celulară, schimbul de idei și rezultate, problemele învățământului și educația tinerilor cercetători sunt probleme prioritare de discuții. Societatea a devenit o platformă unde se practică știință și prietenie. Colegii din țară, unii chiar profesori, mărturiseau la întâlnirile noastre că ”Societatea noastră este o Școală". Era exact ce ne-am dorit.

Curând dupa înființare am început și **programul de Doctorat**. Prof. Nicolae Simionescu și cu mine căpătasem dreptul de a conduce doctorate și în România. Astfel toți tinerii noștri au intrat în acest program care era dificil, exigent și ambițios. Dar văzând pregătirea excelentă

a generațiilor de tineri care au trecut prin program, cred că el a fost (și încă este) util și corect. Am avut și doi studenți la medicină din SUA care au venit să-și înceapă doctoratul cu noi.

În perioada 2000-2008, urmărind aceeași idee de a dezvolta cercetările de Biologie Celulară în toată țara, împreună cu Dr. Anca Sima (director executiv), am organizat în Institut **cursuri post-universitare (8 ediții)** la care au participat cursanți români și conferențiari din institut, din țară și din străinătate. Tinerii cursanți români (cercetători, medici rezidenți) au fost entuziasmați de curs. Și noi, la fel.

Imediat după revoluție, în anul 1990, au venit la noi studenții Facultății de Chimie și ne-au rugat să le ținem **cursuri de Biologie Celulară**. Cine putea să reziste la cererea studenților? Le-am ținut.

Tot în anul 2000, doi profesori din Constanța (Prof. Adrian Bavaru și Prof. Vasile Sârbu) ne-au solicitat călduros să acceptăm să ținem **Cursul de Biologie Celulară la Facultățile de Medicină și Biologie din nou înființată Universitatea din Constanța**. Era destul de complicat pentru noi dar nu am rezistat entuziasmului acestor doi tineri profesori care doreau "să facă ceva important pentru orașul lor, Constanța. Tocmai refuzasem o solicitare asemănătoare de la o importantă universitate privată din București, dar pe ei nu îi puteam refuza. Astfel, timp de 5 ani, noi și colaboratorii noștri din Institut am predat biologia celulară la Universitatea din Constanța, timp în care ei și-au pregătit proprii profesori.

Institutul și Academia Română

Am avut totdeauna conștiința ca un Om trebuie, are obligația, să servească Societatea din care face parte. Noi trebuia să servim cercetarea și cercetătorii.
Nicolae Simionescu și cu mine am fost aleși în 1990 membri corespondenți și în 1991 membri titulari ai Academiei Române. Am privit aceasta ca o oportunitate de a servi comunitatea științifică din țara noastră. În 1991 am scris împreuna un articol în Academica intitulat "Academia- Maxima Scientia et Maxima Moralia". În 1992, Nicolae Simionescu a introdus pentru prima oară în țară, în Academia Română , sistemul de grant-uri competitive care revoluționau sistemul: subvenționarea unui proiect de cercetare urma să se facă după evaluarea serioasa a valorii lui științifice. Greu de înțeles la început, sistemul de grant-uri a fost apoi acceptat de toate forurile care ofereau fonduri de cercetare din România. În 1994, Nicolae Simionescu este ales Vice-președinte al Academiei Române. Își dedica mult din timpel a ul său pentru a re-organiza cercetarea din Academie. Nu a mai avut mult timp pentru asta....

1995 - Nicolae Simionescu a părăsit lumea noastră dar spiritul său a ramas în Institut, pretutindeni în memoria lui, Institutul a fost numit IBPC "Nicolae Simionescu".

Mereu, și în special de Sf. Nicolae sau aniversări anuale, gândul nostru se îndreaptă către Profesorul și Mentorul nostru. Ne întâlnim, vorbim, ne uităm la imagini de demult sau ținem Sesiuni științifice „In Memoriam Acad. Nicolae Simionescu (1926-1995)".

Spun colaboratorii din IBPC: *„Pentru noi, Profesorul Nicolae Simionescu a fost o briză de aer proaspăt în timpurile grele ale regimului comunist. Era o personalitate completă și complexă, în care savantul scrupulos, omul de știință adevărat, educatorul, profesorul autentic și adevăratul patriot se adunau într-o personalitate cu adevărat remarcabilă.*

Am învățat de la Magistrul nostru minunile cercetării, dedicația pentru știință, cum să privești succesul și eșecul, simțul responsabilității, rigoarea, etica și măreția harului intelectual și a valorilor morale care trebuie să completeze un om de știință autentic".

Recunoștință infinită Profesorului nostru.

Colaboratorii din IBPC

În același an, am devenit directorul Institutului. Povestea noastră - "experimentul Simionescu" nu avea voie să se sfârșească aici, trebuia să meargă mai departe... În 1996, am fost aleasă Vice-președinte al Academiei Române pe care am servit-o in doua legislaturi.. Am continuat să conduc sistemul de Grant-uri ale Academiei Române care chiar dacă însemnau sume modeste de bani, aveau un prestigiu mare deoarece evaluarea lor implica un proces foarte strict. Am încercat în cele 14-15 ore pe zi să slujesc mai departe Cercetarea Academică și să nu neglijez Institutul.

Din păcate, sistemul de Grant-uri ale Academiei a fost desființat după mine – în 2004. Nu știu nici acum cine se temea de acest sistem. Încă sper că va fi re-înființat. Era un atu al Academiei noastre...

Conduc secția de Științe Biologice a Academiei Române. Am adus în secția noastră cercetători cu talent, cu opera și cu etică . În plus, mulți dintre ei, erau ...doamne. Și Academia are nevoie de mai multe Doamne!

Fac parte dintre aceia care sprijină și încearcă să protejeze Academia Română și cercetarea fundamentală (cercetarea de bază) care se face preponderent în Academia Română - de cei care din neștiință nu-i dau importanță și nu înțeleg faptul că ea stă la baza tuturor cercetărilor. Orice cercetare care nu are la bază un studiu fundamental serios – nu rezistă în timp. Este ca o casă fară fundament.

Institutul câștigă prin competiție titlul de Centru de Excelență al Comunității Europene

2000. An deosebit de important care a marcat toata viața științifică a institutului

a adus cu el o recunoaștere internațională a rezultatelor cercetărilor noastre, IBPC "Nicolae Simionescu" a fost selectat prin concurs " Centru de Excelență al Comunității Europene." Aplicația pentru această competiție am facut-o împreună cu doctoranda mea, Anca Gafencu și a inclus, pe langă descrierea rezultatelor anterioare, o prezentare clară și concisă a ceea ce ne propunem pentru viitor. Titulatura obținută a permis înzestrarea noastră cu un microscop electronic modern și organizarea unor Simpozioane Internaționale precum "Disfuncția cardiovasculară în hiperlipidemie și diabet" (2002) sau "Biologia celulară și moleculară -cheia pentru a învinge bolile cu risc global" (2004) organizat cu prilejul celei de a 25-a aniversări a institutului nostru.

2005 -A marcat un alt mare succes. Prin competiție am obținut un Grant acordat de către Comunitatea Europeană prin acțiunea specifică de susținere PC6: "Consolidarea Spațiului European de Cercetare prin Consolidarea Competenței Cercetării din România în genomica și proteomica principalelor boli de risc global: Ateroscleroza, diabetul și complicațiile sale" (SERA). Am scris proiectul într-o bună colaborare din nou cu tinerele cercetătoare Anca Gafencu (director executiv) si Madalina Fenyo, doctorandele mele.

2009 – Proiectul "CARDIOPRO" Re-întinerirea Institutului în formă și fond / introducerea de noi tehnologii / modernizarea proiectelor de cercetare

Un mare câștig pentru insitutul nostru. Prin competiție am câștigat un grant valoros (11 milioane Euro) din fonduri structurale pentru proiectul de investiții "CARDIOPRO": "Extinderea și modernizarea infrastructurii de cercetare pentru creșterea competitivității în domeniul bolilor cardiovasculare, diabetului și obezității".Cofinanțare: Fondul European de Dezvoltare Regională - POS, Axa Prioritară 2. Proiectul l-am câștigat în urma unei aplicații complexe și convingătoare , arătând direcțiile pe care vrem să le urmăm în viitor.,

Prin acest proiect intre **2009 -2012** am reîntinerit întreaga structură a institutului, aceasta însemnând laboratoare noi și echipamente de ultimă generație și, în mod implicit, reconsiderarea și modernizarea programului de cercetare cu noi proiecte permise de noile echipamente. Am început astfel studii novatoare în domeniul Proteomicei, Nanomedicinei/ Nanoterapiilor și al Celulelor Stem/Medicină Regenerativă. Rezultatele bune nu s-au lăsat mult așteptate și au fost prezentate de către tinerii din Institut la numeroase manifestări științifice din țară și din străinătate din perioada 2010 - 2014.

În **2013** am primit unul dintre cele mai deosebite onoruri: Cavaler al Legiunii de Onoare (Chevalier de la Legion d'Honneur), al Franței. Îl consider o onoare pentru mine, pentru mentorii mei și pentru echipa mea care mi-a fost alături de-a lungul celor 40 de ani.

Cercetarea în institut continuă într-un ritm alert dar necesitățile sunt din ce în ce mai mari. Competiționam și în anul 2014 cu Dr. Horia Maniu (director de proiect) câștigăm

un Grant cofinanțat din Fondul European de Dezvoltare Regională: "Constituirea unui nou compartiment de sortare și crioprezervare a celulelor pentru cercetare și în scop terapeutic"(SORTIS). Acest Grant a permis înființarea unui laborator performant de Biologie Moleculară și a unui compartiment modern de crioprezervare a celulelor.

Dar cercetarea cere fonduri continuu. Este o preocupare permanenta a intregii echipe obținerea de fonduri care să ne permită continuarea proiectelor pe următorii 3-4 ani.
Competiționam și în 2016 câștigam granturi valoroase acordate prin Programul Operațional pentru Competitivitate 2016-2020. În plus, suntem colaboratori la importante granturi europene.

Datorită rezultatelor proiectelor realizate în noul Departament de Proteomică, cea de a 12- a Conferință de Proteomică din Europa Centrală și de Est (CEEPC) a avut loc în IBPC în 2018.

2019 - După 40 de ani de la înființare

Arata bine! Activitatea din acest an are același ritm ca întotdeauna: cercetare, lupta pentru fonduri, Simpozioane și Școli de vară ținute în cadrul proiectului INTERA" etc. În plus constatam cu bucurie că media de vârstă a personalului din institut a rămas aceeași ca în urmă cu 40 de ani datorită tinerilor care ni s-au alăturat . Pentru ei și pentru noi am organizat împreună cu Fundația Națională de Știință și Artă sesiunea științifică intitulată: "Viitorul cercetării, dezvoltării și inovării în domeniul sănătății. Oportunități pentru România - Horizon Europe ". Au participat importante personalități din Europa de Vest si de Est.

Ce am invățat ? Ce am descoperit?

Am invățat că lumea Celulelor este o lume specială cu reguli și protocoale instaurate și respectate de mii și mii de ani. Fiecare tip de celulă are o funcție, un rol în viață organismului. Unele ne ajută să respirăm, altele să gândim, să scăpăm de colesterolul din sânge, altele ne apară de instruși. Când organismul este atacat de un inamic sau un terorist, apare imediat o armată de celule care au rolul să le apere pe toate celelate.

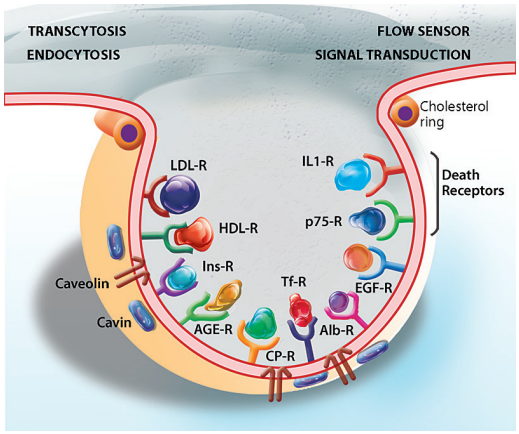
Celula își chivernisește bine viața și interesele. Ea ține în biblioteca ei (în nucleu), toată informația de care are nevoie ca să traiască, să se înmulțească și să-și îndeplinească funcțiile (codul genetic). Are o sursă care îi dă energie (mitocondriile) are o fabricuță care produce proteine (descoperită de Palade) și are un sistem de control ferm a tot ceea ce intră și iese din celulă (membrana). Nu trăiește singură. Celulele s-au adunat într-o lume a lor formând țesuturi, organe, și organisme. Noi toți suntem formați dintr-o aglomerare de celule și suntem rude cu prima celulă aparută pe pământ.
Am învățat că ***Celula – este sediul vieții și al bolii, este – în fapt, pacientul elementar***

Uneori, când agresorul este puternic, celulele se îmbolnăvesc şi pot muri şi odată cu ele, murim şi noi.

Ce trebuie făcut pentru a caştiga lupta cu agresorii? Pentru ai reda celulei sănătatea, astfel încât să işi urmeze netulburată destinul şi rostul ce i s-a hărăzit. Aceasta este întrebarea la care încearcă să răspundă toţi cercetătorii din domeniul biomedical. De aici a apărut şi termenul de "cell doctor" – doctor de celule. Nu este glumă. Tratamentul pentru restaurarea sănătăţii celulelor a început şi cu asta începe tratamentul "inteligent" al bolilor, medicina personalizată, medicina de precizie.

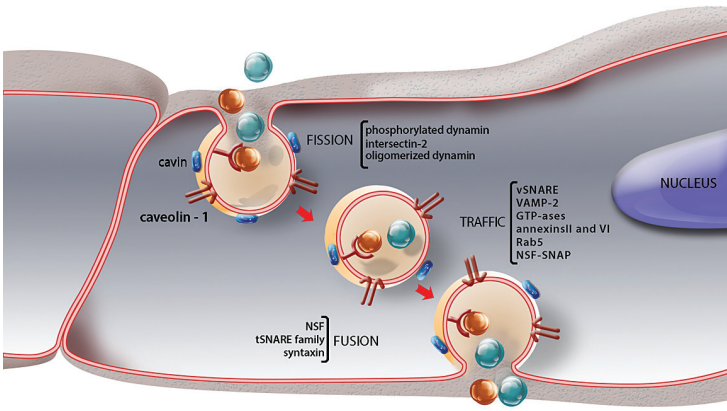
Ce am descoperit? Este o întrebare legitimă pe care ne-o pun mulţi oameni din afara cercetării biomedicale. Am descoperit că celulele care căptuşesc toate vasele de sânge şi inima (întreg sistemul cardiovascular), considerate iniţial o nesemnificativă foiţă de celofan, sunt în fapt sofisticate, inteligente, iscusite şi foarte agere. Vorbim despre celula endotelială, şi numeroasele sale surori, care veghează şi controlează schimbul de substanţe între diferitele medii interne şi astfel, au un rol fundamental în bunăstarea şi funcţionarea organismului.

Între altele, am identificat că aceste celule au pe lângă vezicule (descoperite de G. Palade) şi canale transendoteliale (descoperite de noi) cu care controlează tot ceea ce trebuie – sau nu trebuie - să treacă din sânge la ţesuturi. Suprafaţa acestor celule este diferenţiată în microdomenii distincte ca structură şi chimie şi astfel pot asigura multiple funcţiuni necesare homeostaziei, adică „armoniei„ din organism.



Împreună cu colaboratorii din Institut, am urmărit procesul de trecere a moleculelor prin celule pe care Nicolae Simionescu l-a numit inspirat „transcitoză". I-am descoperit mecanismele cu care asigura selecţia controlată a ceea ce fiziologic trece din sânge la organe (medicamente, proteine cărăuşi, hormoni, etc). Transcitoza s-a dovedit a fi un proces celular universal.

Grupul nostru a identificat (pentru prima oară) receptorii de pe suprafaţă celulelor (ex. receptori pentru albumină, histamină) care sunt implicaţi în procese fiziologice şi patologice majore. Şi multe altele...



Toate datele de biologie celulară obţinute au format fundamentul pentru întelegerea modificărilor patologice care au loc în boala cardiovasculară, diabet şi a complicaţiilor lor.

În patologia celulară, echipa noastră a urmărit şi descoperit evenimentele incipiente (din artere şi valve) care duc la formarea plăcii aterosclerotice, rolul lipoproteinelor, modificarea şi alterarea lor în ateroscleroza şi diabet. Împreună, am descifrat patobiochimia diabetului şi efectul nociv al diversilor factori (ex. hiperglicemia) care duc la cauza principală de mortalitate în această maladie, ateroscleroza accelerată.

Recent, grupul nostru a introdus în proiectele Institutului cercetări preclinice moderne prin care urmărim terapia bolilor cardiovasculare, a diabetului, hipertensiunii, obezităţii.

Nanoterapia și utilizarea nanotehnologiilor moderne, ne-au permis țintirea medicamentelor specific doar către celulele/țesuturile modificate patologic. În medicina regenerativă, echipa noastră a demonstrat că terapia cu celule stem în infarctul de miocard are efecte favorabile, directe și în special indirecte.

Toate aceste rezultate (și altele nemenționate aici) au fost preluate de comunitatea științifică internațională, așa cum ne arată numarul mare de citări ale lucrărilor din Institut în literatura de specialitate. Împreună ele evidențiază împlinirea filozofiei și viziunii inițiale: trecerea proiectelor succesiv de la biologia celulară, la patologia celulară, la terapia celulară.

Nu am descoperit leacul pentru eradicarea bolilor cardiovasculare sau a diabetului (ținta noastră) , care nu au fost descoperite încă, nicăieri în lume și nici leacul contra multor altor boli ale societății moderne. De zeci de ani, mii de cercetători în laboratoare performante și cu fonduri pe măsură, se străduie să atingă primii acest deziderat. Nu suntem încă acolo.

Și noi, ca și alti cercetători știm către ce ne îndreptăm dar nu știm ce vom găsi. Din tot ce am agonisit până acum, știm că suntem pe drumul care duce la deslușirea răspunsului celulei la agresori, înțelegerea mecanismelor dereglate și a capacității lor de reparare - ținta noastră. Acest drum nu e ușor, el trece prin vasta și complexa câmpie a (ne)cunoașterii, care trebuie defrișată încet, cu grijă și cu pași mici.

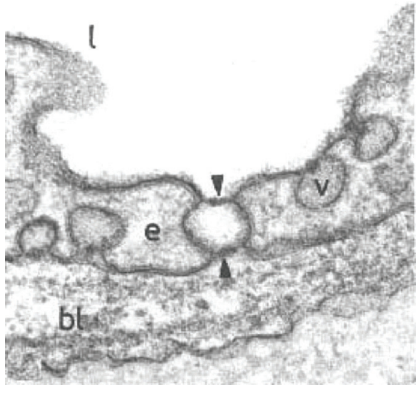
Suntem optimiști. Știm că drumul este corect și ca bogăția pe care am adunat-o în 40 de ani de cercetare va duce sigur la un final fericit pentru tratamentul bolilor cardiovasculare, a diabetului, și a altor maladii. Mă uit cu mari speranțe la tinerii din Institut. Ei au în traista lor adunate tot ce am agonisit noi și cercetătorii din lume în domeniu.

Nu știm dacă noi vom fi primii care să atingem acest țel, dar știm sigur că, prin rezultatele noastre, vom contribui la găsirea soluțiilor și, poate, la tămăduirea bolilor.

Acesta este farmecul cercetării...

Este ca atunci când temerarii au încercat să cucerească Everestul. Au fost multe încercări, unele s-au oprit la 4000 de metri, alții la 6000, alții au mers mai sus - s-a acumulat experiența. În final Neozeelandezul Edmund Hillary și Tenzing Norgay din Nepal au ajuns pe vârf la 8848 metrii. Dar l-au cucerit! Amândoi au afirmat că reușita a fost rezultatul unei munci de echipă a întregii expediții. La fel este si in cercetare...care este tot un fel special de expeditie.

Nu pot să termin acest arc peste 40 de ani, fără să mă gândesc la cei care au făcut posibilă înființarea, viețuirea și supraviețuirea Institutului în decursul timpului: mentorii mei, Instituțiile care ne-au susținut financiar și elevii noștrii, echipa Institutului cu care am străbătut acești ani.



Mentorii mei – Nicolae Simionescu și George Palade. Influența lor asupra mea este inestimabilă

Nu știu cum s-a întâmplat, dacă i-am ales eu sau m-au ales ei pe mine? Cert este că Nicolae Simionescu și George Palade au fost și au rămas pentru totdeauna modelele mele de existență. Interesant, mentorii mei au multe caracteristici comune. Amândoi sunt ceea ce eu numesc „oameni frumoși". Doi antrenori de spirite, două personalități seducătoare, profunde, lângă care ți-ai dori să fii mereu. A fost o șansă să am asemenea modele. Sau, poate, un destin. Sau poate cineva acolo Sus a vrut așa…

Nu i-am imitat, nu am copiat nimic, dar cred că-i observam continuu, și ceea ce îmi plăcea, am adaptat ființei mele. Și mi-au plăcut multe…

Este clar, nu poți să copiezi un model, chiar dacă ai vrea. Devine artificial, nu mai ești tu. Din ceea ce am învățat și preluat de la maeștrii mei, mi-am format, cu bune și mai puțin bune, modul meu de a fi și de a exista în știință și în viață... Influența lor în viața mea științifică este inestimabilă.

Am lucrat bine împreună, poate pentru că eram complementari, fiecare aducea altceva în echipă: experiență, entuziasm, profunzime, optimism și talent experimental. Vă las să ghiciți cine aducea ce în proiectele noastre. The "famous Romanian trio", gândea știința și viața în știință, la fel.

Tribut Instituțiilor care ne-au susținut financiar în acești 40 de ani

În primul rând, IBPC nu ar fi supraviețuit timpurilor grele din perioada comunismului fără granturile câștigate de la Institutul Național de Sănătate (NIH) din SUA. Faptul că NIH dădea acces liber să competiționezi pentru fonduri a fost salvarea noastră pentru 13 ani (1981-

1995). Este de admirat și atitudinea evaluatorilor americani care nu au ținut seama ca este o cerere de grant din afara SUA, dintr-o țară comunistă ...și chiar competitorii noștri au evaluat proiectele noastre doar prin valoarea lor.
După 1993 am început să obținem grant-uri competitive din România de la Academia Română, apoi de la Ministerul Educației și Cercetării și de la Comunitatea Europeană.
Fără aceste fonduri – ideile și proiectele noastre adormeau în așteptare....

Au crescut în Institut patru generații de cercetători; Prețioasa noastră echipă

Aleși cu mare grijă, prima generație de cercetători (1979) au fost cei care au stat la temelia proiectelor de început. În 1989, unii dintre elevii noștii au plecat să guste știința și viața occidentului. Interesant că majoritatea au continuat pe proiecte apropiate de cele din Institut. Oricum, ei tot „ai noștri" au rămas. Tristețea plecării lor din Institut a fost curând înlocuită de speranța venită odată cu intrarea noilor tineri în Institut. Ei s-au dovedit egal de buni cu cei plecați și au intrat repede în „starea de grație" creiată în Institut. În plus, cei care prin alegere au rămas să ducem mai departe Institutul au devenit – șefi de departament sau „lideri" de grup. Împreuna cu ei, am format o noua generație care ni s-a alăturat iar acum suntem la a patra generație – foarte promițătoare - de tineri, absolvenți, masteranzi sau doctoranzi.

Îi admir pe toți. Pot spune că îi iubesc pentru devoțiunea lor pentru cercetare – în condițiile în care în țara noastră – cercetarea este departe de a fi o prioritate.

Să crezi că imposibilul nu există.

Nicolae Simionescu și cu mine am dorit să facem ceva care să dăinuie în timp și, am vrut să facem asta tocmai pentru că erau timpuri foarte grele... Am considerat greutăţile, o provocare și provocarea, o ștachetă pe care trebuie să o trecem. Am tratat eşecul şi succesul – acești doi mari impostori (cum spune R. Kipling) la fel, și ne-am ascuns necazurile în nisip și ne-am săpat bucuriile în Stâncă (Sfântul Augustin) .
Am făcut știință cu conștiința. Am învăţat să privim cu umilinţă lumea Viului şi să intrăm cu smerenie în Ţara Ştiinţei şi Lumea Celulelor.

Și mai ales…am învățat că trebuie să încerci până reușești. Și dacă nu reușești ... să încerci din nou ...Dar pentru asta trebuie să crezi că imposibilul nu există.

Ce am pus în traistă pe care o port cu mine pretutindeni? Speră –visează–iubește - iartă–zâmbește–ajută - fii generos și mai ales acționează!!!

Am avut șansa ca în toți acești ani, băieții noștri, Vlad și Dan Simionescu deși tineri, să înțeleagă ceea ce vrem să facem, să fie alături de noi în tote momentele importante și, în același timp să-și construiască destinul și profesiunea pe care o doreau: Vlad - arhitectura și Dan - cercetare biomedicală.

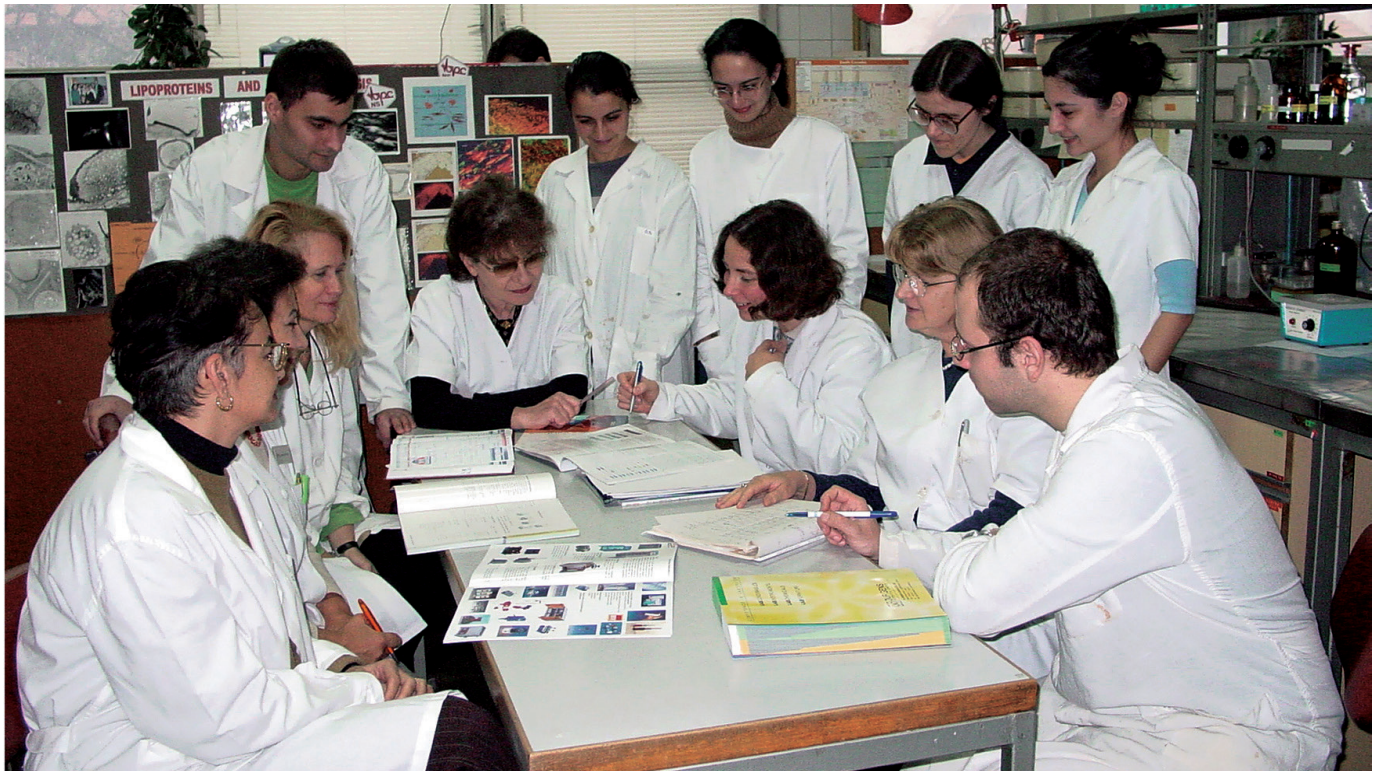
Le mulțumesc!

Datoria memoriei. Așa, cu încercări reușite si ne-reușite (dar de care nu vorbim) am ajuns azi la marea noastră sărbătoare pe care o considerăm o sărbătoare a științei românești : a 40-a aniversare a IBPC-NS.

Împreună cu colaboratoarele mele, Dr. Anca Sima si Dr. Ileana Mânduțeanu, ajutate de de tineri entuziaști, Dr. Mirel Popa și Dr. Loredan Niculescu am gândit că poate cei veniți recent în Institut sau alți prieteni vor să cunoască povestea noastră, pe care nu avem dreptul să o dăm uitării. Este „datoria memoriei" cum se spune – o datorie pe care o vrem împlinită prin această carte. Ea adună în ea imagini și texte care ne-au însoțit în călătoria noastră, care ne-au menținut "rațiunea de a exista" în perioadele grele, tulburi prin care am trecut sau atunci când, ca în orice proces de cercetare, treceam prin eșec/succes sau eșec/eșec/succes.

Vă invităm să parcurgeți acest volum de „Istorie si Memorie" cu imagini și evocări adunate dintr-o: ***"călătorie incredibilă de 40 de ani – pentru descoperirea secretelor celulei în beneficiul sănătății Omului".***

Maya Simionescu
Co-fondator împreună cu Nicolae Simionescu și
Director al IBPC-NS



Genesis and Evolution of the Institute of Cellular Biology and Pathology “Nicolae Simionescu”

A short non-romantic incursion into the “History and Memory” of the Institute, dedicated to my illustrious mentors Prof. Nicolae Simionescu and Prof. George Palade

The cell is a mystery. Since the beginning of times and always, Man has tried to solve the mysteries of life. With simple means at first, with complex technology today, it was acknowledged that the cell hides in itself the secret of life, disease, and death. To understand it, to be acquainted with the cell, it has been Man’s dream for hundreds of years.

The daring, the visionaries and the experimentalists have revealed the portrait of a cell: a small independent creature capable of living, functioning, multiplying. It performs numerous functions. However, the function also brings dysfunctions. Why? How? In what way?

Alongside many researchers in the world, we have also embarked in this quest, here, at home; just two at the beginning, we were later joined by other seekers and then, today, we got to be a team – a small army trying to shed light on the “Mysteries of the Cell”.

I believe in the power of an Institution. Our little army of researchers gathered in what is today the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" (ICBP-NS).

While trying to split in periods the genesis and development of our Institute, I notice that:

- 1970 – 1979 was the American period, in which the idea appeared, which seemed like a beautiful but almost impossible dream, then the period in which the dream slowly got a form and then materialized in a 5-storey building, equipped with machines and especially with young people. A great hope;
- 1979-1989 was the period in which we started our activity and moved from the Dream to the Reality – at home, and
- after 1989 – we passed to... a new Reality.

Here is, in brief, the story that George Palade called **“The Simionescus Experiment.”**

1970 – 1979
Roots of the Institute: Rockefeller University
- A bold idea appears -

23 July 1970. One of the happiest days of my life. After 6 months of waiting, after a negative response, after countless insistences from Prof. George Palade, my passport for the trip to the USA is approved, on July 23rd.
I left on July 25th. While on the plane, I recalled that day in 1969, when Professor Palade, who was on a visit to various institutes in Romania, also stopped at the Institute of Endocrinology, where we were doing research under the careful guidance of a very demanding mentor, Prof. Nicolae Simionescu. We show him our projects, what and how we work, and what we have achieved. He talks very little, asks how many people work with us, we tell him "just the two of us and two good technicians", and then he leaves. Less than a year later, we receive an invitation that seemed to have come from Tutankamon. Professor George Palade invites Nicolae Simionescu and myself to work with him at Rockefeller for "a year, maybe two." With some difficulties, Nicolae Simionescu leaves on 1 February 1970. I am not allowed to leave. Husband and wife leaving at the same time.... It was dangerous...

I don't remember much about the trip to New York. I just know that we landed at Kennedy Airport and the next day I was already working in the laboratory.
The professors explained me the project we were working on. My enthusiasm was unbridled. We frequently worked 14 hours a day. I started well, the first images I made at the electron microscope – were exactly what we were looking for and became the evidence that our hypothesis needed. "The beginner's luck".

The Rockefeller University is a special intellectual environment, as a researcher you can not wish for anything else. Our contact with the American scientific and cultural life, marked by Prof. Palade's personality, by the real science ambiance, it was for us astound and a challenge. All of a sound, a thought appears: Let's try (1) to create at home an oasis of true science in which the young researchers from Romania will be able deploy their talent, imagination and creative capabilities, and (2) to bring cellular biology to our country, this new science that we felt was going to revolutionize all the life sciences, and not only. Philosophically – I think the institute had to appear. It was the historic moment for this new science, and it had to reach Romania....

1971-1972 We begin to think seriously about what seemed to be almost "impossible". We were making the first sketches of the future Institute. We were starting the formalities.
Nicolae Simionescu, in an interview with Nicolae Tone, remembers that period: "
…and, at some point, in 1972, in some very amusing circumstances, I sat down with Maya in front of a wrapping paper and we said, both of us, at the same time: «*Let's make (in Romania) a modern center of cellular biology, let's gather some young people around us, let's grow them as a kind of family and thus provide an oasis of work, tranquility and seriousness*»."

Meanwhile, our research and collaboration with Prof. Palade are going very well. The results obtained and presented at various Congresses (1979-1989) made our collaboration to stretch from "a year maybe two" to over 10 years; moreover, in the meantime, we became for

the Americans "the famous Romanian trio".

It was a time when we were working enthusiastically at day, and dreaming at night. Professor Palade describes this period in the best words:

"Among experiments, discoveries, selections of micrographs and drafting of manuscripts, Nicolae and Maya Simionescu began working at the plans of an ambitious project: a new laboratory to be built in Bucharest.

The initiative belonged to them entirely.

My role in this new project was to find, together with them, the paths and mechanisms to ensure the viability of this institute in Romania."

We begin numerous preparations, we go through all formalities, we defeat the bureaucracy and especially convince the authorities of those times of the need and importance of the new Institute. I do not think we would have succeeded without the continuous interventions and support of Professor George Palade, of Corneliu Bogdan, our ambassador in the USA, and of our friend and Prof. Palade's friend, the great surgeon, Theodor Burghelea, Minister of Health at the time.

Regarding our decision, Nicolae Simionescu tells Nicolae Tone *"We could not change the regime – but we thought we could change something in the lives of intelligent and gifted young Romanians and in the same time we could return the chance that we had, to work with George Palade in the U.S. (at Rockefeller and Yale)."*

1973. We receive the approval to found the Institute we wanted. NicolaeSimionescu quickly leaves for Bucharest – he chooses as a site for the new Institute an area at no. 8, B.P. Haşdeu Str., because it was vacant and since it was near other university centres (faculties of Biology, Chemistry, Medicine, Veterinary Medicine, Institutes Cantacuzino and Babeş).

We immediately began to sketch the architectural plans of the Institute. We had the experience of moving and arranging the new Department of Cellular Biology at Yale University, where Prof. Palade and some collaborators (including us) had moved. We used every free moment, especially in the evening, to draft everything that was going to happen in every room of the fifth floors of the new Institute. The Romanian architects liked the plan and used it as such.

1974. The construction starts. Nicolae Simionescu comes to Bucharest to hammer the stakes that mark the perimeter of the future Institute. He puts one or two dollars at the foundation of the building, to ensure future wealth. A worker tells him, "Professor, do not put a dollar in the ground – in the future, the authorities may pull down the building to take the dollar." To monitor the construction, we come to Bucharest once or twice each year.

We establish the research programme of the new Institute and think that for the future, at home, we should shift from cellular biology to cellular pathology (pathology was the secret love of NicolaeSimionescu) and focus our efforts on a major problem of modern society and the main cause of mortality in developed countries, including Romania: ***Cellular Biopathology and Cellular Pharmacology of the diseases of the Cardiovascular System*** (atherosclerosis, diabetes, etc.). At that time, like now, it seems that every 10 minutes a man dies of cardiovascular disease. It was and it is a serious scientific challenge and important from the socio-economic point of view. We wanted to understand the cardiovascular disease, to control it, and heal it afterwards. Ambitious plan, a killing disease studied by hundreds of scientists all around the world.

And even more than that.

The history of Europe, including ours, has suffered enormously because many decisive judgments have been taken by people affected by cardiovascular diseases. At the Yalta conference in February 1945, our fate was decided by three people all having advanced coronary artery disease: Roosevelt, who dies in April 1945, Stalin in 1955 and Churchill in 1965, of stroke.

The credo of our research, that became the Credo of the Institute, was:
"Cellular and Molecular Biology for the benefit of Human Health"

We had become quite known, and the relationships with researchers from prestigious laboratories in the USA helped us to get places for stages of specialization and 13 one-year-Fullbright fellowships for young researchers from Bucharest. Thus, during some of the visits, we interviewed graduate students from the faculties of Chemistry, Biochemistry, Biology, Biophysics, Medicine, etc., and we chose 13 young people that were sent for specialization in the best biomedical laboratories in the US.

We order all the equipment necessary for the research in cellular biology and, to avoid isolation, we make sure we have a library with about 25 subscriptions to the main international scientific journals. With a one-year interruption due to the shattering earthquake of 1977, the building is finished in 1979.

To avoid our isolation in Romania, Prof. Palade has an important idea (as usual). Let's not go home until an agreement is signed between Yale University and the Romanian Ministry of Education, in which to specify the obligation for the two of us to come three months a year to Yale, to participate in cell biology courses and to continue our collaboration. The agreement was signed for six years. It functioned with minor problems for 6 years, then it was more and more difficult.

Thus, between 1970-79, our Institute, which started from our first plans made on wrapping paper, and continuing with the choice of the land in Bucharest, and with the finalization of the construction, decorated with modern equipments, with carefully chosen young researchers from Romania and two seniors, and is ready for work.

For the Institute we interviewed about 1200 people and we chose 80 or 100 (from the doorman to researcher).

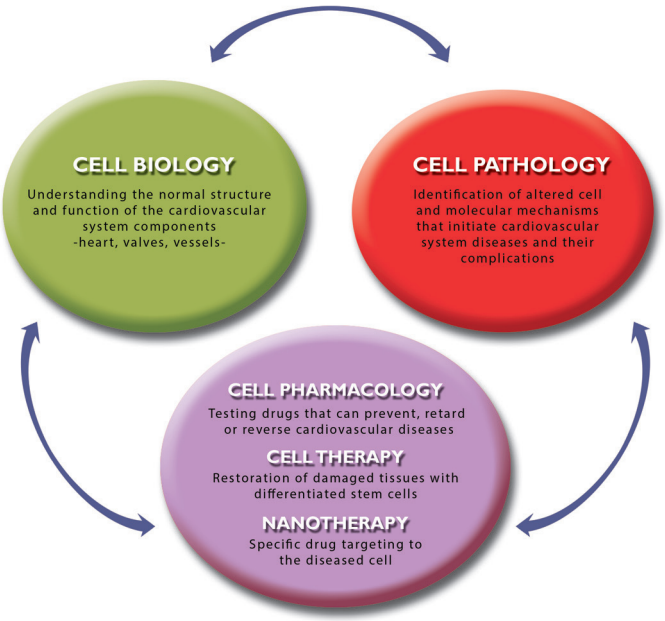
We were preparing for the inauguration. Bad signs began to show. Three days before the inauguration we are officially announced by the Ministry of Education that we do not have the right to organize the symposium and the Ministry will not cover the plane tickets for the guests. We were desperate; some of our invited scientists were already travelling and were in Europe. The Institute is looking for solutions. Professor Nicolae Simionescu offers our new car (Peugeot) to the Ministry, to cover the expenses. In the same afternoon, the young staff in the Institute volunteer to donate their wages for a month or two, for the same purpose. After 3 days, a "guardian angel" intervened and made it possible to support the Symposium. Even today I do not know where the solution came from and who our protector was.

September 3, 1979 - ICBP is officially inaugurated with a Romanian-American symposium: *"Transport of macromolecules in the cellular systems". Participants from the USA: professors George Palade, Christian de Duve and Gunter Blobel, Nobel Prize laureates, as well as*

professors Marilyn Farquhar, David Sabatini and, from Germany,professor Werner Franke.

1979-1989
A Dream became Reality/but... difficulties start to show...
"Man needs a dream to face reality." (S. Freud)

We began with great enthusiasm the projects whose succession looked, in our vision, as below.



Our basic philosophy consisted of successive or concomitant research into the normal functioning of the heart and blood vessels (Cellular Biology), followed by the identification of the alterations occurring in the various vascular segments (Cellular Pathology), to reach the final target of slowing down or eradicating the evolution of diseases of the cardiovascular system and of their complications (Cellular Pharmacology, Cellular Therapy).

We all realized that heart diseases are a focal point subject in the life of the individual, and that if we are to understand them, ourselves or others, this will be "a small step for us but a giant leap for mankind." In addition, there was something romantic in our research - we studied the heart, which, as the poet says

"The heart, by its beatings, applauses our existence" *(Lucian Blaga).*

Soon, the first results began to appear – and they were promising.

A special state was created in the Institute. We stopped at the Institute's gate everything that was going on outside and, at least in the 10-12 hours while we were working, we tried to forget about the oppressive system and the hardships we had to live through. Moreover, the life in the Institute was like life in a family. We had a cafeteria, where two wonderful ladies prepared good soup every day and called the youngsters to lunch. In the same cafeteria, we listened to symphonic music during lunch and, on the tables, there were placed leaflets about the

composer. We managed to rent twice a week a tennis court from the National Bank, where we played tennis with many young people from the Institute. We celebrated Christmas every year and Santa Claus came with gifts for children – our children. We did all this because we had the faith that:

An institute is a School
An institute is a Home
An institute is a Family
Research is a Way of Life.

And today I still think a research institute must be a school where one must not give speeches from the desk, but examples. In a real research institute there is a "state of grace" that includes curiosity, honesty, resistance to speculations and approximations – respect for scientific truth – a state of correct communication, all having a common purpose: true science – science that makes Science and Knowledge advance. To accept and transmit that ***"truth is what stands the test of experience"*** (A. Einstein).

Our joy did not last long; it was the foreword for the troubles to come. At the beginning of 1980 we were notified that all our research funds were cut off. No money for chemical products or materials, no library subscriptions, nothing, nothing. The few funds we had were for our little wages and administrative expenses of the building.

We were totally desperate. We had to find a way out, a solution. Sir Medawar says ***"Science is the art of finding solutions"***. And we found them.

In the **1980**s, the only institution that offered, by competition, research funding outside its country's borders was the National Institute for Health (NIH) in the USA. We immediately made a first grant application, we competed with all the American applicants and we won, in 1981, the first grant for 3 years.

Just before finishing it, we make an application for a new competitive grant and, thanks to the results already achieved, we won the 2nd grant and then, with the same system, we got the 3rd grant. In 1990, another American grant system, FIRCA (Fogarty International Research Collaborative Award), was launched at NIH. We applied and won two grants in collaboration with Prof. Samuel Silverstein and a second with Prof. David Stern of Columbia University in New York (where we were also "visiting professors").
Therefore, all the research of the Institute between 1979-1995 was subsidized by the NIH-US grants.

Between 1979-1989, the viability, the avoidance of isolation and the survival of the Institute in the very difficult conditions of the communism was possible mainly through the common will of our group "to beat the system". In addition, at the wise initiative of Professor Palade, together with NicolaeSimionescu, we were appointed visiting professors at Yale University, New Haven, being involved annually for 3 months in teaching and research activities. This association facilitated the continuation of privileged links with USA universities and outstanding specialists in the field, new scientific exchanges and avoiding isolation, as well as obtaining scholarships for ICBP researchers. During these years, 15 young researchers from the Institute were trained in prestigious American universities. In addition, the Institute organised 5 Romanian-American symposiums, funded by NIH-USA, that were vital for avoiding isolation and maintaining modern research.

During that bad history, research was our salvation. We proved that the regime cannot

overturn the Land of Science – because there, our minds were free and our thinking had no limits.... The only boundaries were our own boundaries.

We won the "bet" with history! We have never had the vocation to resign... It is a big mistake to say that, during the communism regime, Romania was a "Siberia of the spirit". Writers wrote, researchers researched...Because no regime can overrun your spirit. During that dramatic historical and social period – precisely because it was hard and almost impossible according to some people – we succeeded in our sanctuary to deploy – as we could – our ideas – our wishes – and to maintain the pale light of Romanian research. We were like in the story of the "Little Match Girl": we permanently kept the match lit (in our institute, the lamp) and we were researching the best that we could. That is why, after just 10 years of existence, our institute gained a good place among the European institutes.

As I mentioned, in the Institute we were united by a common desire: "To beat the system" by good research. It was our way of resisting in an infernal time. It was our way of living with our heads held high – during a period that could easily bend our backs. Only now I do realize how lucky we were to have our profession.

In September 1989, we had the visit of a friend working in the Ministry of Education and Research: he confidentially told us, in the yard of the Institute, that we are on the "blacklist" and we better prepare to answer 3 serious accusations that were on the table of "Comrade" Elena Ceaușescu: 1. we sell our secrets to the Americans; 2. we publish only in foreign journals, not in Romanian ones and 3. our research plan was not approved by the "Cabinet 2" (that was true, nor did we consider it necessary). The rest of it, just rubbish!!!!!

Lucky us, the moment "1989" came. That was when we knew that we defeated the skepticals who did not believe in our success and endurance and we knew that **we had won the "bet" with history!**

Freedom had come! We quickly understood that, at first, democracy is shy and the freedom is fragile: a free horse is beautiful, a free tiger is dangerous. Now, we could fully develop; we know well **that research means both freedom and responsibility.**

1989-1990-The fall of communism brought only few changes in the structure of the Institute.

- ICBP was affiliated with the Romanian Academy.
- Only after 10 years of activity, from an unknown site, ICBP became a Member Institution of the UNESCO-MCBN Global Network (Molecular and Cellular Biology Network).
- A number of our researchers wanted to experience scientific life in Europe and the United States. Our team's chance was that they were replaced by young people with talent and desire for research, so that the change did not affect our performance.

1992 - Based on our results, we won two FIRCA-NIH-US Collaboration grants (3 years each) with Prof. Samuel Silverstein and Prof. David Stern of Columbia University, New York, USA. In addition, we had some funds for collaborations from European Community and won a Grant from the Swiss National Science Foundation for a collaborative project. (1997). These were the signs that we are working on something important and that our results are valid, accepted and appreciated.

Our Institute and the Teaching of Cell Biology Preparing future generations

From the very beginning, we set four important goals for the Institute: 1. biomedical research, 2. spreading cellular Biology in all university centers in the country; 3 preparing new generations of researchers, and 4. facilitating international exchanges.

Since its foundation, in 1979, **the laboratories of the Institute have been opened** (as well as the library) for anyone who wanted to learn techniques or methods of research. Very many researchers from the country have crossed the institute's stepdoor to learn the mysteries of cellular biology.

Less than 3 years after its foundation, in 1982, at the initiative of Prof. Nicolae Simionescu and together with professors from all the university entres around the country, we founded the **Romanian Society of Cellular Biology**. Ever since, it has become a very active, enthusiastic society, today composed of approximately 450 members from across the country. Since its foundation, the Society organizes an annual congress in which the main priorities are: news from the research in cellular biology, the exchange of ideas and exposure of data, the problems of education and the training of young researchers. The Society has become a platform where science and friendship are practiced. Colleagues in the country, some of them, professors, confessed in our meetings that "our Society is a school". It was exactly what we wanted.

Soon after the founding, we also started **the doctoral program**. Prof. Nicolae and I had the right to lead doctorates in Romania. Thus, all our youth entered this program that was difficult, demanding and ambitious. But seeing the excellent level of the generations of young people who went through the program, I think it was (and still is) useful and correct. We had two US medical students who came to start their PhD with us.

Between 2000-2008, following the same idea of developing cellular biology research throughout the country, together with Dr. AncaSima (Executive director), we organized in the Institute **post-graduate courses (8 editions)** attended by Romanian trainees and lecturers from the Institute, from Romania and abroad. Young Romanian trainees (researchers, resident physicians) were enthusiastic about the course. So were we.

Right after the revolution, in 1990, students from the Faculty of Chemistry came to us and asked to offer them a course in **Cellular Biology**. Who could resist the student's request? We organized the courses.

Also in the year 2000, two young professors from Constanta (Prof. Adrian Bavaru and Prof. Vasile Sârbu) gently asked us to accept to provide the course of **Cell Biology at the Faculties of Medicine and Biology at the newly - opened University of Constanta.** It was quite complicated for us, but we did not resist the enthusiasm of these two professors, who wanted "to do something important for their city, Constanţa". It was the moment when we had just declined a similar request from a private university in Bucharest, but we could not refuse them. Thus, for 5 years, we and our collaborators from the institute taught cellular biology at the University of Constanta, while they prepared their own professors.

The Institute and the Romanian Academy

We have always had the conscience that an individual must, and has the obligation to

serve the Society it belongs to. We had to serve the science and the researchers.

Nicolae Simionescu and I were elected in 1990 correspondent members and in 1991 full members of the Romanian Academy. We took this as an opportunity to serve the scientific community in our country. In 1991, we wrote together an article in Academica titled "Academia-Maxim Scientia et Maxima Moralia". In 1992, Nicolae Simionescu introduced for the first time in the country, in the Romanian Academy, the competitive grant system that revolutionized the system: a research project should be funded after a thorough evaluation of its scientific value. Hard to understand at first, the grant system was then accepted by all the forums that offers research funds in Romania. In 1994, Nicolae Simionescu is elected Vice-President of the Romanian Academy. He dedicates much of his time to re-organize the research in the Academy. He did not have too much time for this....

1995-Nicolae Simionescu left our world but his spirit remained in the Institute, everywhere.
In his memory, the institute was named ICBP "Nicolae Simionescu".

Always, and especially on St. Nicholas or annual anniversaries, we think about our professor and mentor. We meet, we talk, we look at images of long ago or we organize scientific Sessions "In Memoriam Acad. Nicolae Simionescu (1926-1995)".

The collaborators in ICBP wrote: *"For us, Professor Nicolae Simionescu was a breeze of fresh air in the hard times of the communist regime. He was a complete and complex personality, in which the scrupulous scientist, the true researcher, the educator, the authentic teacher and the true patriot gathered in a truly remarkable personality.*
We have learned from our Magister the wonders of research, dedication to science, how to look at the success and failure, the sense of responsibility, rigor, ethics and greatness of intellectual grace and moral values that must complement an authentic scientist".

Infinite gratitude to our Professor.
ICBP collaborators

That same year, I became the director of the Institute. Our story-"The Simionescu Experiment" could not be allowed to end here, it had to go on...
In 1996, I was elected Vice-President of the Romanian Academy, and I served for two terms. I continued to run the Grant system of the Romanian Academy, which, even though it meant modest amounts of funds, had a high prestige because their evaluation involved a very strict process. I tried in the 14-15 hours a day to continue to serve the academic research and not to neglect the institute.

Unfortunately, the Academy's grant system was interrupted after I left –in 2004. I don't know who was afraid of this system. I still hope it will be continued. It was an asset of our academy...
I run the Section of Biological Sciences of the Romanian Academy. We brought in our Section researchers with talent, good scientific work and ethics. In addition, many of them were... ladies. And the Academy needs more ladies!
I am among those who support and try to protect the Romanian Academy and the fundamental research (basic research) which is mainly made in the Romanian Academy - from those who, by ignorance, do not give its importance and do not understand that it is the basis of all research.

Any research that is not based on a fundamental and serious study – does not resist in time. It's like a house without a foundation.

The Institute wins by competition the title of Centre of Excellence of the European Community

2000 - A particularly important year that marked the entire scientific life of the Institute brought an international recognition of the results of our research: ICBP "Nicolae Simionescu" was selected by competition "Centre of Excellence of the European Community." I prepared the application together with my PhD student, Anca Gafencu, and we included, besides the description of the previous results, a clear and concise presentation of what we are proposing for the future.

The title we received allowed our Institute to be equipped with a modern electron microscope and to organize different international symposia such as "Cardiovascular dysfunction in hyperlipidemia and diabetes" (2002) or "Cellular and molecular biology - the key to defeat global risk diseases " (2004) organized on the occasion of the 25th anniversary of our Institute.

2005 - Marked another great success. By competition, we obtained a grant from the European Community, through the specific support action PC6: "Strengthening the European research area by strengthening the competence of research in Romania in genomics and proteomics of the main Global risk Diseases: atherosclerosis, diabetes and its complications "(SERA). I wrote the project in a good collaboration with the young researchers, Anca Gafencu (executive director) and Madalina Fenyo, my PhD students.

The Institute wins by competition the project "CARDIOPRO" Rejuvenation of the institute in form and content /introduction of new technologies/modernization of the research projects

2009 A key success for our institute. By competition, we won a valuable grant (11 million Euro) from the Structural Funds for the "CARDIOPRO" investment project: "Expanding and modernizing the research infrastructure to increase competitiveness in the field of cardiovascular diseases, diabetes and obesity ".

Co-funding: European Regional Development Fund-POS, priority axis 2.

The project got funded following a complex and compelling application, showing the directions we want to follow in the future,

Through this project,between **2009-2012**, we rejuvenated the entire structure of the Institute, meaning new laboratories and equipment of the latest generation and, by default, reconsideration and modernization of the research program with new projects allowed by the new equipment.

As such, we started innovative studies in the field of Proteomics, Nanomedicine/ nanotherapies and stem cells/Regenerative medicine.

The good results appeared quickly and were presented by the young researchers of the Institute in numerous scientific manifestations either in the country or abroad, between

2010 and 2014.

In **2013** I received one of the most distinguished honors: "Chevalier de la Légiond'Honneur, from France. I consider it an honor for myself, for my mentors and for my team that has been with me during the last 40 years.

Research in the institute continues at a fast pace, but the needs are getting bigger. Together with Dr. HoriaManiu (Project director), we competed in 2014 and won a Grant financed from the European Fund for Regional Development: "Setting up a new sorting and cryopreservation compartment of cells for research and therapeutic purposes" (SORTIS). This Grant allowed for the establishment of a high-performance laboratory of molecular biology and a modern cell cryopreservation department.

But research demands continuous funding. It is a permanent concern for the whole team to get funds that allow us to continue the projects for the next 3-4 years.

We competed in 2016 and won valuable grants awarded through the Operational Programme for competitiveness 2016-2020. In addition, we are collaborators to important European grants: EXPERT, (ERA-CVD), MULTIBUBBLE (FRIPRO programme, Norway), ExploreCAD (ERA-CVD).

Due to the results of the projects carried out in the new Proteomic department, the 12th Conference of Proteomics of Central and Eastern Europe (CEEPC) took place in ICBP in 2018.

2019 – The Institute 40 years after its foundation

It looks good! This year's activity has the same rhythm as ever: research, struggle for funds, symposia and summer schools held within the INTERA project, etc.

In addition, we were pleased to note that the average age of the staff in the Institute remained the same as 40 years ago, due to the young people who joined us. For them and for us we organized, together with the National Science and Art Foundation a scientific session titled: "The Future of research, development and innovation in the field of health. Opportunities for Romania- Horizon Europe". Important personalities from Western and Eastern Europe participated.

What have we learned? What have we discovered?

We have learned that the world of cells is a particular world with rules and protocols established and respected for thousands and thousands of years. Each type of cell has a function, a role in the body's life. Some help us breathe, others to think, others help us to get rid of the cholesterol from the blood, and others defend us from intruders. When the body is attacked by an enemy or a terrorist, an army of cells immediately emerge to defend all the others.

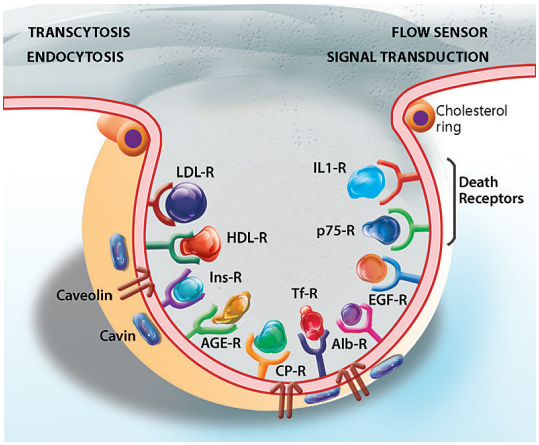
The cell takes good care of its own life and interests. She keeps in its library (in the nucleus) all the information it needs to exist, multiply and to do its function (genetic code). It has an inner source of energy (mitochondrias), a small factory that produces proteins (discovered by Palade), and a firm system to control everything that enters and exits the cell (membrane). It doesn't live alone. The cells gathered in a world of their own, forming tissues, organs, and organisms. We all are made up of cells and are related to the first cell on Earth.

We have learned that ***the cell – is the site of life and disease, it is the elementary patient.***

Sometimes, when the attacker is too strong, the cells get sick and they can die and with them, we die too.

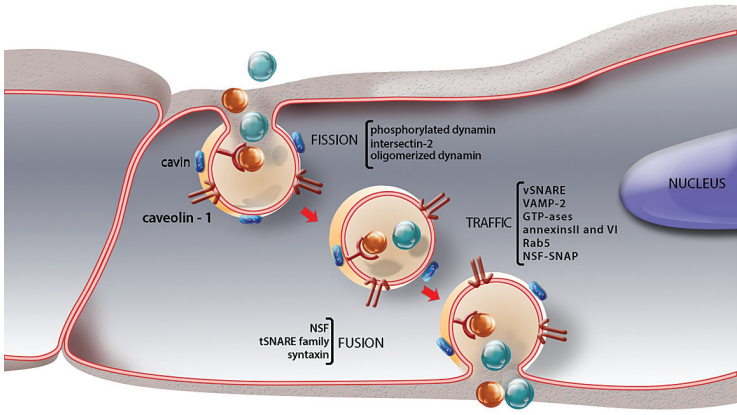
What must be done to win the fight with the aggressors? To restore the cell's health, so that it follows undisturbed its destiny and the purpose for which it exist? This is the question that all researchers in the biomedical field are trying to answer. That's why, recently, the term "cell doctor" was launched - the doctor who treats cells. It's not a joke. The treatment for restoring the health of the cells has already started and with this also begins the "intelligent" treatment of diseases, the personalized medicine, the precision medicine.

What have we discovered? It's a legitimate question that many people from outside biomedical research are asking us. We discovered that the cells that upholster all the blood vessels and the heart (the entire cardiovascular system), initially considered as an insignificant foil of cellophane, are in fact sophisticated, intelligent, skillful and very agile cells. This endothelial cell, and its many sisters, watch and control the exchange of substances between different environments and thus have a fundamental role in the welfare and functioning of the organism.



Among other things, we have identified that, besides vesicles (discovered by G. Palade), these cells also have trans-cellular channels (discovered by us), with which they control everything that must– and must not pass from the blood to the tissues. The surface of these cells is differentiated in microdomains distinct as structure and chemistry and thus can provide various functions necessary for body homeostasis, i.e. the "harmony" within the body.

Together with our collaborators in the Institute, we followed the process by which molecules cross directly through cells, that Nicolae Simionescu called "Transcytosis". We discovered the mechanisms that ensured the controlled selection of what physiologically passes from the bloodstream to the organs (drugs, transport proteins, hormones, etc.). Transcytosis turned out to be a universal cellular process.



Our group identified (for the first time) receptors on the surface of cells (e.g. receptors for albumin, histamine) that are involved in major physiological and pathological processes. And many more...

All these cellular biology data formed the foundation for understanding the pathological changes occurring in the cardiovascular disease, diabetes and in their complications.

In cellular pathology, our team pursued and discovered (in arteries and valves) the early events that lead to the formation of the atherosclerotic plaque, the role of lipoproteins,

their modification and alteration in atherosclerosis and diabetes. Together, we analyzed the pathobiochemistry of diabetes and the harmful effect of the various factors (e.g. hyperglycemia) leading to the main cause of mortality in this disease, namely accelerated atherosclerosis.

Recently, our group introduced among the projects of the Institute, modern preclinical research, through which we pursue the therapy of cardiovascular diseases, diabetes, hypertension, obesity. Nanotherapy and the use of modern nanotechnologies have allowed us to target specific drugs only to pathologically altered cells/tissues. In regenerative medicine, our team has shown that in myocardial infarction, stem cell therapy has direct, and especially indirect favorable effects.

All these results (and others, not mentioned here) have been accepted by the international scientific community, as shown by the large number of quotations of the works done in the Institute. Together, they highlight the fulfillment of the initial philosophy and vision: **the evolution of projects from cellular biology, to cellular pathology, to cellular therapy.**

We have not discovered the cure for the eradication of cardiovascular diseases or diabetes (our targets), as nobody has discovered yet, anywhere in the world, and neither the cure against many other diseases of modern society. For decades, thousands of researchers in high-performing laboratories and with honorable funds, strive to be the first to reach this objective. We're not there yet.

We, like other researchers, know what we are heading for, but we don't know what we are going to find. From what we have managed to collect thus far, we know we are on the road that leads to uncovering the answer of the cell to aggressors, to understanding the altered mechanisms and their capability to be repaired -our target. This road is not easy, it passes through the vast and complex plain of ignorance/ knowledge, which must be slowly, carefully and with small steps deforested,

We're optimistic. We know that the road is correct and that the wealth of data that we have gathered in 40 years of research will surely lead to a happy ending for the treatment of cardiovascular diseases, diabetes, and other diseases. I look with great hopes at the young people of the Institute. They have in their pockets everything we have earned, ourselves and all the researchers in the world.

We do not know if we will be the first to touch this goal, but we know for sure that, through our results, we will be of help to find solutions and perhaps to heal diseases.

That is the beauty of research...

It's like when the risk takers tried to conquer Everest. There were many attempts, some stopped at 4000 meters, others at 6000, others went higher and the experience accumulated. Finally, it was Edmund Hillary, from Newzealand, and Tenzing Norgay, fromNepal, that reached the peak, at 8848 meters. But they conquered it! They both said that the success was the result of a team work of the entire expedition. As in research... which is also a kind of expedition.

I cannot end this arch over 40 years without thinking of those who have made it possible for the Institute to be founded, to stay alive and to survive over time: my mentors, the institutions that have financially supported us and our collaborators, the Institute's team, from yesterday and today, with whom we have traveled these 40 years.

My mentors – NicolaeSimionescu and George Palade. They had an ivaluable influence on me.

I don't know how it happened, if I chose them or if they chose me? The fact is that Nicolae Simionescu and George Palade were and have forever remained my models of existence. Interestingly, my mentors have many common features. They're both what I call "beautiful people." Two trainers of the spirit, two deep, seductive personalities, next to whom you would always want to be. It was a chance to have such models. Or maybe a destiny. Or maybe someone up there wanted it so...
I didn't imitate them, I didn't copy anything, but I think I observed them continuously, and I adapted to myself what I liked in them. And I liked so many things...
Clearly, you can't copy a model even if you want to. It's getting artificial, it's not you anymore. From what I learned and took from my masters, I have shaped, with good and less good, my way of being and existing in science and in life... Their influence in my scientific life is invaluable.

We worked well together, maybe because we were complementary, each of us brought something else into the team: experience, enthusiasm, profundity, optimism and experimental talent. I let you guess who brought what into our projects. The "Famous Romanian trio" thought science and life in science in the same manner.

Tribute to the institutions that have financially supported us in these 40 years

Firstly, ICBP would not have survived the hard times during communism without grants earned from the US National Health Institute (NIH). The fact that NIH gave free access to compete for funds was our salvation for 13 years (1981-1995). The attitude of the American evaluators was extraordinary: they did not take into account that our request came from outside the US, from a communist country... And even our competitors appreciated our projects only based on their value.
After 1993 we began to obtain competitive grants from Romania, from the Romanian Academy, then from the Ministry of Education and Research and from the European Community.
Without these funds – our ideas and projects were asleep, waiting....

Four generations of researchers have grown up in the Institute - our precious team

Very carefully selected, the first generation of researchers (1979) were at the basis of the starting projects. In 1989, some of our students went to try the science and the life of the West. Interestingly, most of them continued in projects close to those in the Institute. Anyway, they all remained ours". The sadness when they left was soon replaced by the hope that came with the new young people entering the Institute. They proved equally good as the former ones and they quickly entered the "state of grace" created here. In addition, those

who chose to stay in the institute became – heads of departments or group leaders. Together with them, we shaped a new generation of scientists that joined us and now we are at the fourth generation – very promising - of young people, graduates, MS or PhD students.

I admire all of them. I can say that I love them for their devotion to research – especially that in our country, research is far from being a priority.

To believe that the impossible doesn't exist.

Nicolae Simionescu and myself, we wanted to do something that would endure in time and, we wanted to do this just because they were very difficult times... We took the hard times as challenges and the challenges as a lath we had to cross. We treated equally the failure and the success - these two great impostors (as R. Kipling says), and *"buried the sorrows in the sand and the joys in the rock* (St. Augustine).

We have done science with consciousness. We learned to look humbly at the world of the the living and enter with humility in the Land of Science and the world of cells.
And in particular... we learned that you have to try until you succeed. And if you fail... Try again... But for that you must believe that the impossible does not exist.

What did I put in the bag I carry with me everywhere? Hope – dream – love - forgive – smile– help - be generous and especially Act!!

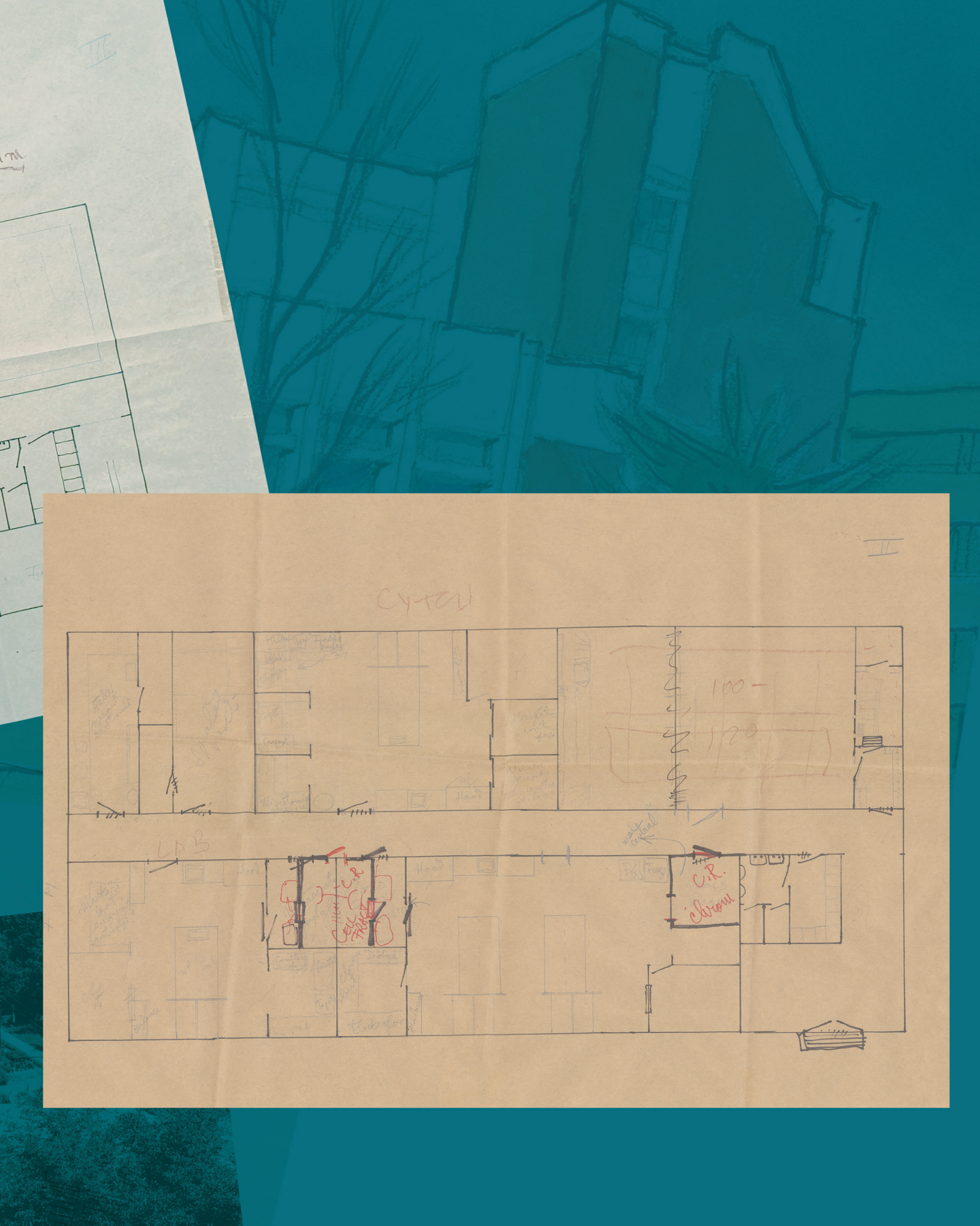
We had the chance that all over this period, our sons, Vlad and Dan Simionescu, although very young, understood what we want to do, and were next to us all through the important moments and in the same time they build their destiny and profession they wanted, Vlad - as an architect and Dan, in the biomedical research. I am thankful

The Responsibility of the Memory. So, with successful and unsuccessful attempts (of which we do not speak) we are today at our great celebration which we consider a celebration of the Romanian science: the 40th anniversary of ICBP-NS.

Together with my collaborators, Dr. Anca Sima and Dr. Ileana Mânduţeanu and helped by the enthusiastic Dr. Mirel Popa and Dr. Loredan Niculescu, we thought that those recently arrived in the Institute or other friends would like to know our story, the story that we do not have the right to forget. It is the "responsability of the memory" as they say – a duty we want to be fulfilled through this book. It gathers in it images and texts that have accompanied us on our journey, which have maintained our "raison d'être" in the difficult, troubled times that we lived through, or when, as in any research process, we were passing through failure/success or failure/failure/success.

We invite you to browse through this volume of "History and memory" with images and evocations gathered from an: ***"Incredible 40 year journey– discovering the secrets of the cell for the benefit of human health".***

Maya Simionescu
Co-fondator împreună cu Nicolae Simionescu și
Director al IBPC-NS

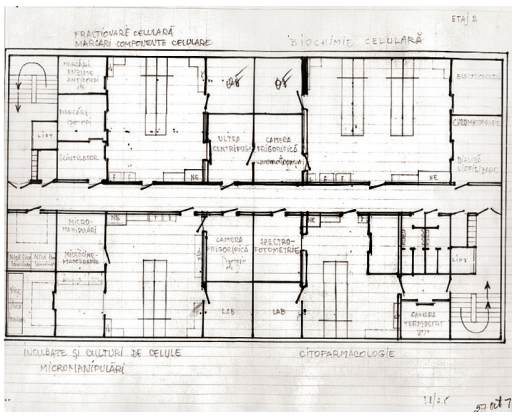


DEVENIREA IBPC IN IMAGINI SI CUVINTE

1970 -1979
Vis / Viziune

1979 – 1989
de la Vis la Realitate

1989 – prezent
o nouă Realitate



Rădăcinile IBPC:
Universitatea Rockefeller și Universitatea Yale, SUA

George E. Palade ,

"Printre experimente, descoperiri, selectări de microfotografii și redactări de manuscrise, Nicolae și Maya Simionescu au început să lucreze la planurile unui proiect ambițios: un nou laborator care urma să fie construit în București.
Inițiativa le-a aparținut în întregime.
Rolul meu în acest nou proiect a fost de a găsi împreună cu ei căile și mecanismele care să asigure viabilitatea acestui institut în România."

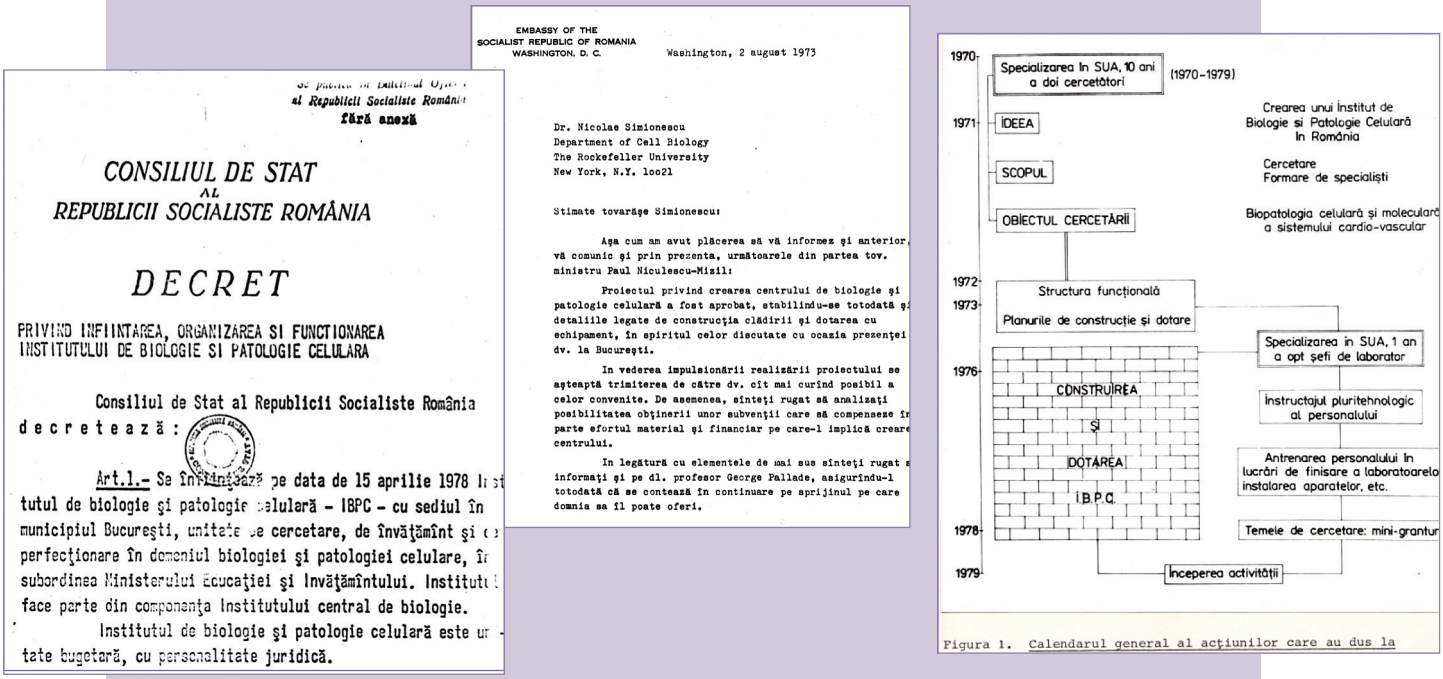
…." So, in between experiments, finding new tracers, sorting micrographs and writing manuscripts, Nicolae Simionescu and Maya Simionescu started working on the plans for a new laboratory to be built in Bucharest.
The initiative was entirely theirs.
My role in this new venture was to devise, together with them,
ways and mechanisms that could ensure the viability of this Romanian Institute".

la Universitatea Rockefeller în SUA

Pregătiri:	formalități, birocrație, convingerea autorităților
Sprijin :	George Palade, Corneliu Bogdan, Theodor Burghelea
Alegerea	locului, schițarea planurilor arhitecturale
Selecționarea :	13 cercetători tineri – burse Fulbright
Stabilirea	programului de cercetare
Construirea	casei noastre științifice - **IBPC**
1979:	Clădire, echipament modern, 13 cercetători specializați, Nicolae și Maya Simionescu se întorc definitiv acasă

1979 - 1989

[1979 - 1989]



CONSILIUL DE STAT
AL
REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

DECRET

PRIVIND INFIINTAREA, ORGANIZAREA SI FUNCTIONAREA INSTITUTULUI DE BIOLOGIE SI PATOLOGIE CELULARA

Consiliul de Stat al Republicii Socialiste România
decretează:

Art.1.- Se înființează pe data de 15 aprilie 1978 Institutul de biologie și patologie celulară - IBPC - cu sediul în municipiul București, unitate de cercetare, de învățământ și de perfecționare în domeniul biologiei și patologiei celulare, în subordinea Ministerului Educației și Invățământului. Institutul face parte din componența Institutului central de biologie.

Institutul de biologie și patologie celulară este unitate bugetară, cu personalitate juridică.

EMBASSY OF THE
SOCIALIST REPUBLIC OF ROMANIA
WASHINGTON, D. C.

Washington, 2 august 1973

Dr. Nicolae Simionescu
Department of Cell Biology
The Rockefeller University
New York, N.Y. 10021

Stimate tovarăşe Simionescu:

Aşa cum am avut plăcerea să vă informez şi anterior, vă comunic şi prin prezenta, următoarele din partea tov. ministru Paul Niculescu-Mizil:

Proiectul privind crearea centrului de biologie şi patologie celulară a fost aprobat, stabilindu-se totodată şi detaliile legate de construcţia clădirii şi dotarea cu echipament, în spiritul celor discutate cu ocazia prezenţei dv. la Bucureşti.

In vederea impulsionării realizării proiectului se aşteaptă trimiterea de către dv. cît mai curînd posibil a celor convenite. De asemenea, sînteţi rugat să analizaţi posibilitatea obţinerii unor subvenţii care să compenseze în parte efortul material şi financiar pe care-l implică crearea centrului.

In legătură cu elementele de mai sus sînteţi rugat să informaţi şi pe dl. profesor George Pallade, asigurîndu-l totodată că se contează în continuare pe sprijinul pe care domnia sa îl poate oferi.

Figura 1. Calendarul general al acţiunilor care au dus la

1979 - 1989

■ Deschiderea oficială a IBPC: Simpozion inaugural - Septembrie 1979: "Transportul macromoleculelor în sistemele celulare"

■ Primul Grant Competitiv- NIH – 1981

■ Înființarea Societății Romane de Biologie Celulară - 1982

■ Al doilea Simpozion România-SUA: "Biologia celulara a peretelui vascular" -1983

■ Al patrulea Simpozion România-SUA: "Evenimente celulare şi moleculare în aterogeneză" -1985

■ Al cincilea Simpozion România-SUA: "Patobiochimia peretelui vascular" -1989

■ Trei Granturi Competitive castigate de la NIH (1981 - 1989) obținute succesiv

Deschiderea oficială a IBPC: Simpozionul inaugural, Septembrie 1979

INSTITUTUL
DE
BIOLOGIE ŞI PATOLOGIE CELULARĂ
Bucureşti

COLOCVIUL INAUGURAL

pe tema
„Transportul macromoleculelor în sistemele celulare"
3-5 Septembrie, 1979

PROGRAM

Luni 3 Septembrie

9,00 Deschiderea colocviului
10,00 Pauză
10,20 *George E. Palade:* Biogeneza membranelor celulare
Discuţii
11,20 *Günter Blobel:* Transportul proteinelor în interiorul şi prin membranele celulare
Discuţii

Marţi 4 Septembrie

9,00 *Marylin G. Farquhar:* Reciclarea membranelor celulare
Discuţii
10,00 Pauză
10,20 *David Sabatini:* Sinteza şi mecanismele distribuţiei proteinelor organelelor şi membranelor
Discuţii

Miercuri 5 Septembrie

9,00 *Christian de Duve:* Terapia lisosomotropică
Discuţii
10,00 Pauză
10,20 *Werner W. Franke:* Structurile citoscheletice fibrilare şi nefibrilare
Discuţii
Încheierea colocviului

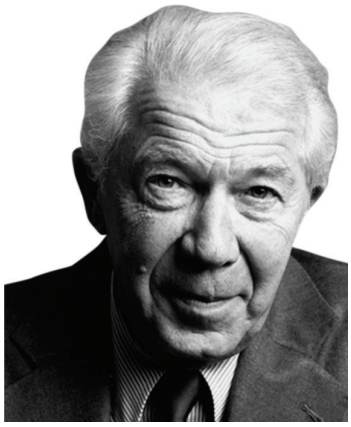
Conferinţele vor avea loc în Amfiteatrul Institutului şi vor fi susţinute în limba engleză.
Accesul în amfiteatru se face pe bază de invitaţii.

Prof. George Palade si Prof. Christian de Duve, Laureați ai Premiului Nobel, la inaugurare...

A început ca un vis -
au trecut ani,
dar - cu trecerea anilor - visul a
prins încet, dar sigur, viață.
Și a deschis într-adevăr
o fereastră spre viitor.
Prin sprijin de sus,
prin eforturile fiecăruia în
colțul laboratorului lui - dar ei.
Visul tradus în viață o să se
transforme sigur în fapte, în
împliniri ce vor încălzi inima
Futuror.

Sept 8. 79 G. E. Palade

Cred că acest nou institut se alătură unui domeniu extraordinar de interesant de cercetare, poate cel mai important, cel mai avansat domeniu științific în momentul de față și poate domeniul cel mai important pe care l-a atins vreodată omenirea.



Eu ca biolog îl consider mai important decât domeniul cercetării în fizica nucleară, mai important decât cercetarea spațială. Este vorba de cercetarea asupra vieții, cercetarea asupra celulei vii, deci asupra mecanismelor și naturii vieții, și o cercetare a noastră înșine ca oameni, o cercetare asupra naturii umane. Și cred în această situație că este extrem de important pentru țara dumneavoastră să participe în mod foarte activ la această cercetare deosebit de importantă prin noul său institut.

Dar, mai mult decât atât, acest institut se va ocupa și de alte lucruri, anume de aplicații posibile ale acestor noi cercetări și a acestor noi cunoștințe. Și nu trebuie să vă spun că în ultimii 30 de ani cunoașterea noastră în ceea ce privește celula vie, materia vie, a progresat foarte mult.

Acest institut va încerca să găsească aplicații pozitive ale acestor noi cunoștințe, aplicații în sănătatea umană, în medicina umană, în bunăstarea umană în general. Astfel că îmi permit să consider aceasta un lucru deosebit de important.

Profesor Christian de Duve

București 3 septembrie 1979

Profesor
Ion Juvara

Îl cunosc pe Dr. Nicolae Simionescu din 1953 când, în dorinţa mea de a avea colaboratori tineri şi dornici de a se instrui, a fost numit în Clinica Chirurgicală pe care o conduceam. Am lucrat împreună 4 ani, tânărul Dr. Simionescu distingându-se prin întreaga sa activitate ca un element ieşit din comun, poate prea bun pentru a rămâne doar un "simplu chirurg". Aşa se face, probabil că a trecut în cercetarea ştiinţifică fundamentală în care i-am urmărit activitatea şi care a culminat prin specializarea sa în Biologia Celulară.

Institutul pe care îl conduce, conceput personal atât din punct de vedere organizatoric cât şi funcţional precum şi calitatea cercetărilor sale deosebite pe care le face marchează din plin calităţile sale deosebite pe care le-am constatat cu ocazia colaborării noastre. A ştiut să-şi aleagă colaboratorii, a ştiut să-i dirijeze creând o unitate de cercetare care reprezintă o şcoală şi un unicat în ţara noastră. Vreau să subliniez de asemenea simţul său patriotic în sensul creerii în ţara noastră a unei unităţi şi a unei activităţi cu răsunet internaţional.

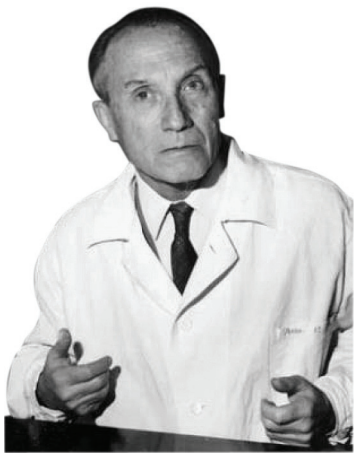
Soţia sa Maya Simionescu a fost şi este o colaboratoare excepţională care l-a secondat permanent în întreaga sa activitate.

Îi felicit pe soţii Simionescu şi le doresc mari succese în activitatea lor.

Cu veche şi constantă prietenie

Profesor
Stefan Milcu

Institutul de Biologie şi Patologie Celulară este asemănător unei opere de artă prin concepţia ce a stat la baza construcţiei sale prin distribuţia spaţiilor şi prin armonia legăturilor funcţionale.



Nu este surprinzător că a fost realizat astfel de doi iluştri elevi ai şcolii româneşti de biologie şi medicină, care au reuşit să se impună prin opera lor în lumea ştiinţifică contemporană şi să ajungă la poziţii de prestigiu.

Elevilor şi prietenilor Dr. Nicolae şi Maya Simionescu le datorăm admiraţia şi recunoştiinţa pentru tot ce au făcut şi pentru tot ce vor dărui ştiinţei în anii viitori, ce-i dorim să fie îndelungaţi şi rodnici.

Vă urez deplină realizare în tot ceace întreprindeţi.

THE THRILL OF SCIENCE

Prof. Christian de Duve
Nobel Prize Laureate

Farewell Dinner 7 September 1979

Yesterday, one of you asked me a question: "How do you get a Nobel Prize?" Of course, I know it was asked in jest. But if you don't mind, I would like to give a serious answer to it: "Don't work for it."

It may happen in the life of a scientist that he or she earns some sort of visible reward, such as a prize, an invitation to deliver a lecture at a major congress, election to an academy, an honorary degree, or some other similar token of appreciation. The trouble about such rewards is that they come very infrequently, if at all, and usually very late. Anybody who would enter the field of science with the aim of earning them would be a fool. No, the rewards of science are different.

The thrill of science is when you stay awake at night thinking about your problem, turning it over in your mind, struggling with it, worrying about it, until suddenly an idea comes to you, a possible explanation, a new experimental approach that may lead to a solution.

The thrill of science is when you can't wait to get up in the morning and to get to your laboratory in order to test your idea and do the experiment you thought of.

The thrill of science is in the actual performance of the experiment, the almost sensuous pleasure of handling pipettes, test tubes, measuring instruments – and, I presume, microscopes – the physical joy that

EMOTIA ŞTIINTEI

Prof. Christian de Duve
Laureat al Premiului Nobel

Cuvântare la dineul final,
7 Septembrie 1979

Unul dintre dumneavoastră m-a întrebat ieri: "Cum se poate câștiga un Premiu Nobel?" Am știut că este o glumă. Aș vrea însă să dau un răspuns serios la întrebarea aceasta: "Nu lucrați cu scopul Premiului Nobel".

În viață se întâmplă ca un cercetător/o cercetătoare să dobândească o apreciere, ca un premiu, o invitație de a susține o conferință la un congres important, să fie ales/aleasă ca membru al unei academii, să obțină un grad onorific, sau alte semne de apreciere. Problema este însă că astfel de aprecieri au loc foarte rar, și de obicei foarte târziu în viață. Un om care intră în domeniul științei cu scopul de a obține o apreciere este absolut nebun. Recompensele și aprecierile din știință sunt cu totul altele.

Emoția științei este atunci când nu poți dormi noaptea gândindu-te la problema care te frământă, întorcând-o pe toate fețele în mintea ta, luptându-te cu ea până când îti vine in minte o idee, o explicație posibilă, o nouă cale experimentală care ar putea conduce la o soluție.

Emoția științei este atunci când nu ai răbdare să ajungi dimineață la laborator și să-ți experimentezi ideea făcând experimentul la care te-ai gândit.

Emoția științei este rezultatul experimentului, plăcerea aproape senzuală a atingerii pipetelor, eprubetelor, a instrumentelor de masură, și a

comes with using your hands skillfully and accurately.

The thrill of science is when you start seeing your results coming out….., and come to realize, as is often the case, that something went wrong with the experiment and that it has to be done over again, or that there is something wrong with your idea and that you must give your problem more thought.

The thrill of science is when you finally have gathered enough results, and start writing them up for publication, throwing one version after the other into the waste-paper basket, until you finally arrive at something you think is worthy to be submitted for publication ….., only to receive your manuscript back a few weeks later with a number of more or less unkind comments.

The thrill of science is to see your paper for the first time in print, to receive your first reprint request, and to learn that somewhere, on the other side of the world, there is somebody who is actually interested in what you have been doing.

The thrill of science is to feel part of a team, to interact with your friends and colleagues, whether in heated discussions or in the exhilaration of shared satisfactions, and on a wider scale, to find yourself part of a world-wide network, of a truly international community with common goals, common interests, common standards.

Those are your daily rewards, irreplaceable, immensely valuable. If, however, being human – aren't we all? – you want some reassurance from the outside, in addition to your own inner satisfactions, then my advice to you is: Aim at earning the respect of those you respect.

microscoapelor, bucuria fizică a folosirii mâinilor tale cu iscusință și cu acuratețe.

Emoția științei este atunci când începi să vezi primele rezultate… și îți dai seama, cum se întamplă adesea, că a fost ceva greșit în experiment și el trebuie refăcut, sau că este ceva greșit în ideea ta și trebuie să o regândesti.

Emoția științei este atunci când ai adunat destule rezultate și începi să le scri pentru publicare, aruncând la coș versiune după versiune, până când final ajungi la ceva care crezi că merită a fi publicat….., pentru ca dupa câteva săptămâni să primești înapoi manuscrisul văzut de referenți cu observațiile acestora mai mult sau mai puțin amabile. Emoția științei este de a-ți vedea lucrarea apărută, de a primi primele cereri de extrase, și de a realiza că undeva, la celălalt capăt al pamântului se află cineva chiar interesat în ceea ce ai făcut.

Emoția științei este aceea de a te simți parte a unei echipe, de a interacționa cu prietenii și colegii tăi indiferent dacă în discuții aprinse sau în împărtășirea satisfacțiilor, și, la o scară mai largă de a te simți parte a unei rețele mondiale, a comunității internaționale cu aceleași scopuri, interese și standarde.

Acestea sunt recompensele zilnice, de neînlocuit și cu o valoare imensă. Dacă totuși – oameni suntem – doriți și o asigurare dinafară, pe lângă satisfacțiile personale, atunci sfatul meu este: încearcă să câștigi respectul celor pe care tu însuti îi respecți.

FINANTAREA IBPC INTRE 1980 – 1995

1980
- imediat după deschiderea oficială a IBPC guvernul comunist ne-a tăiat toate fondurile de cercetare, cu excepţia salariilor

National Institute of Health –USA

1981 -1983 ; 1984-1986; 1987-1989
- trei granturi competitive -

Fogarty International Research Collaborative Award (FIRCA-NIH) -1992 – 1995
in colaborare cu Prof. S. Silverstein, Columbia University, NY

Fogarty International Research Collaborative Award (FIRCA-NIH) -1992 – 1995
in colaborare cu Prof. D. Stern, Columbia University, NY

Welcome Trust Grant, Anglia

Universitatea Yale - de la prieteni "cu dragoste"
Bunuri - cărţi şi substanţe chimice aduse în fiecare an
1980 - 1994
~14 000 kg

Astfel,timp de 14 ani cercetarea în Institut afostbsuşţinută, în principal, din granturi competitive câştigate de la Institutul Național de Cercetare, SUA.

Înființarea și Primul Congres al Societății Române de Biologie Celulară, București, Iulie 1982

Conferința de constituire a Societății Naționale de Biologie celulară / 2 iulie1982

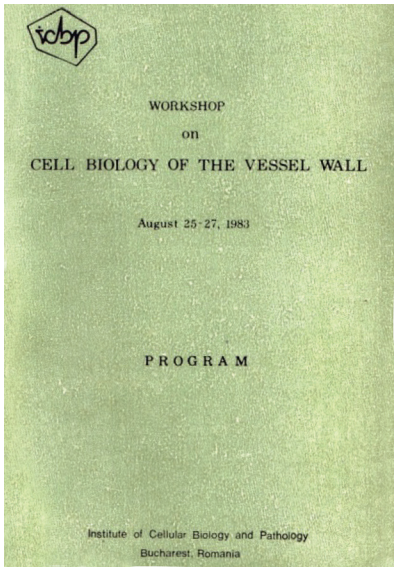
Cercetători din IBPC la Primul Congres European de Biologie Celulară Paris, Septembrie 1982

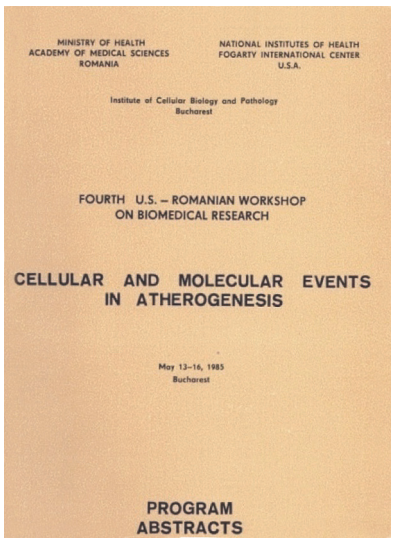
A doua Sesiune a Societății Române de Biologie Celulară, București, Iunie 1984

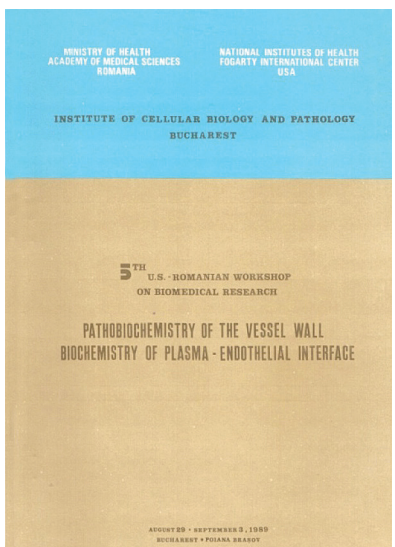
Vlad Voiculescu | Nicolae Cajal | Nicolae Simionescu | Cecilia Motaş | Stefan Milcu | Maya Simionescu

SOCIETATEA NATIONALĂ
DE
BIOLOGIE CELULARĂ

Între 1979 – 1989 au avut loc în IBPC cinci Simpozioane Româno -Americane, subvenționate de NIH







Între profesorii participanți din SUA s-au regăsit:

George E. Palade, Yale University Medical School, New Haven, CT,
Ramzi S.Cotran, Harvard Medical School and Brigham, Boston ,
Alan M. Fogelman, UCLA, School of Medicine, Los Angeles CA ,
Michael A. Gimbrone, Jr., Brigham and Women` s Hospital, Boston
Samuel C. Silverstein, Columbia University , New York, NY
Nicholas Kefalides, University of Pennsylvania, Philadelphia PA
Russel Ross, Washington University, Seattle WA
Marilyn G.Farquhar –Yale University School of Medicine, New Haven, CT,
Dontscho Kerjaschki, Universitat Wien, Wien, Austria
David M. Stern, Columbia University New York, NY
Maurice J.Karnovschi –Harvard Medical School, Boston, MA, USA
Daniel Steinberg –University of California, San Diego, La Jolla, CA,
Robert W.Wissler –University of Chicago, Chicago, IL, USA
Anthony E. Milici, Yale University Medical School, New Haven, CT ,
Richard G.W.Anderson –Universitatea din Texas, Dallas, Texas
Stanley D.Fowler –Univrsitatea Carolina de Sud, Columbia, USA
Ross G. Gerrity– Clinica Cleveland, Cleveland, Ohio
Henry F. Hoff – Fundația Clinică din Cleveland, Cleveland, Ohio
James D.Jamieson – Yale University, New Haven, Connecticut
Isabelle Joris –Universitatea Massachusetts, Worcester, Massachusetts
Howard S. Kruth – NIH, Bethesda, Maryland
Guido Majno –Universitatea Massachusetts, Worcester, Massachusetts
Sampath Parthasarathy –Universitatea din California San Diego, La Jolla, CA
Judah Folkman –Harvard Medical School, Boston MA, USA

1985- WORKSHOP ROMANO- AMERICAN

INSTITUTUL
DE
BIOLOGIE ŞI PATOLOGIE CELULARĂ
SOCIETATEA NAŢIONALĂ DE BIOLOGIE CELULARĂ
B

Crăciunul, Ziua Femeii (8 martie), Ziua Bărbatului (8 aprilie) erau Sărbători nelipsite în Institut

PLUGUSOR

Aho, aho, colidători
Cei cu toți cercetători,
Mic sau mare,
Slab sau tare
Am venit ca fiecare
Tot cu clasica urare:
Un an Nou cu bucurie
Sănătate şi frăție
Si în ăst lăcaş să fie!
Si să fie tema, temă,
Fără umbre de dilemă,
Si-n cuprins ea să tot fie
Clară ca lumina vie
Si cu iz de biologie
Celulară,
Peste tot prioritară.
Tehnici multe, dar alese,
Cu determinări culese
In lumina, cum se ştie,
Gospodari şi-n energie.
Rezultate multe şi cu spor
Pentru ştiința tuturor
Si acestea să tot vină
Să se bată la maşină
Rând pe rând, nu toate-odat'
După ce bine s-au verificat.
Si să iasă experimentu'
Tot în focus şi pe centru.
Dar de fotografiat să fie
Câte una, nu o mie,
Că şi filmele-s, cum spun
De lucrat, cu mic consum.
Si să fie casa - casă
Si să fie masa - masă
Iar Viorica tot voioasă,
De la cozi să nu mai vie
Mai mult moartă decât vie.
Si-ntreținerea să meargă
Ca şi trenurile-n gară;
Să-nțeleagă tot românu'
Ca Viziru-i numai unu'.
Dragomir ce aripi are
De la Hermes apucate
Si le poartă-n patru vânturi
Să aducă unicate;
Ba maşini, ba şurubele,
Chiar şi-un Hercule-n ulcele!
Iară partea de nord-vest
Ce cuprinde-ntregul test
Al mişcării de rotare
Personal -
Aprovizionare
Să le fie şi-aci casa
Dar pe drumurile băncii
Dorim mai puține cozi
Numa' bune să le-nozi!
Muncă multă anu' are
Si omătul nu apare,
Dar când o veni puhoiu'
Să-l tot vezi pe Lixăndroiu
Cum înoată prin nămeți
Doar ca să ne dea lopeți.
Si de mergi cu gândul dus
Si-ntorci fața spre apus
Intri-n fine-n cercetare
Tot de cardio-vasculare
Că-i Farmaco-
Că e Cito
Deşi e fiziologie
Tot ce mişcă-n astă parte
Sunt cuprinşi de veselie ...
Aho, aho, colidători
Cei cu toți cercetători,
Mic sau mare,
Slab sau tare
Am venit ca fiecare
Tot cu clasica urare:
Un an Nou cu bucurie
Sănătate şi frăție
Si în ăst lăcaş să fie!
Si să fie tema, temă,
Fără umbre de dilemă,
Si-n cuprins ea să tot fie
Clară ca lumina vie
Si cu iz de biologie
Celulară,
Peste tot prioritară.
Tehnici multe, dar alese,
Cu determinări culese
In lumina, cum se ştie,
Gospodari şi-n energie.
Rezultate multe şi cu spor
Pentru ştiința tuturor
Si acestea să tot vină
Să se bată la maşină
Rând pe rând, nu toate-odat'
După ce bine s-au verificat.
Si să iasă experimentu'
Tot în focus şi pe centru.
Dar de fotografiat să fie
Câte una, nu o mie,
Că şi filmele-s, cum spun
De lucrat, cu mic consum.
Si să fie casa - casă
Si să fie masa - masă
Iar Viorica tot voioasă,
De la cozi să nu mai vie
Mai mult moartă decât vie.
Si-ntreținerea să meargă

Ca şi trenurile-n gară;
Să-nțeleagă tot românu'
Ca Viziru-i numai unu'.
Dragomir ce aripi are
De la Hermes apucate
Si le poartă-n patru vânturi
Să aducă unicate;
Ba maşini, ba şurubele,
Chiar şi-un Hercule-n ulcele!
Iară partea de nord-vest
Ce cuprinde-ntregul test
Al mişcării de rotare
Personal -
Aprovizionare
Să le fie şi-aci casa
Dar pe drumurile băncii
Dorim mai puține cozi
Numa' bune să le-nozi!
Muncă multă anu' are
Si omătul nu apare,
Dar când o veni puhoiu'
Să-l tot vezi pe Lixăndroiu
Cum înoată prin nămeți
Doar ca să ne dea lopeți.
Si de mergi cu gândul dus
Si-ntorci fața spre apus
Intri-n fine-n cercetare
Tot de cardio-vasculare
Că-i Farmaco-
Că e Cito
Deşi e fiziologie
Tot ce mişcă-n astă parte
Sunt cuprinşi de veselie ...
Iar frontonul la parter
Pe lângă beton şi fier
Să-nceapă şi-n ăst an
Tot cu bunul Lugojan.
Care are-n colagen
Bun prieten, sprijin ferm
Un suport mai omogen
Iară ca într-o tetină
Tine tot fibronectină.
Insă Relu - Nicanor
Tot în cuplu dau cu spor
Să-nțepe-ntr-o chindie
O celulă-n pălărie
Si atât' se tot agită
Că celula obosită
Se tot lasă înțepată
Să se termine odată!
Si de mergi cu gândul dus
Numai cu-un etaj în plus
Dai de foto, unde cei
Ce fac mândre poze-n trei
Si mai mari şi tot mai mici
Ba-i aici, ba nu-i aici
De când sunt se tot agită
Deşi fac, dar mult mai strică!
De la microscopul mic
Salutări de tip voinic
Dar de-ar fi de povestit
Ce-a avut de pătimit
Mai că ne-ar da de gândit.
Aho, aho, cei noi şi vechi
Fiți cu toți numai urechi
Când la seminar se spune
Mereu despre lucruri bune.
Ce e-n lumea cercetării
D-aci până-n fundul zării.
Când din lume adunate
Profesorul din sac le scoate
Si le scrie în direct
Si te-aşează la obiect
Când raportezi la proiect.
Că pământul e rotund
Cei plecați, foarte curând
Din America cea mare
Se întorc în cercetare;
Si să zicem mai cuminți
Mai de viață îmbrăcați
Si de lucru mai legați.
Si aşa în pas cu anu'
Vine rându' tot la anu'
Să se ducă şi să vină
Plin de ştiință şi lumină.
Aho, aho, iubiți confrați
Dacă timpul trece iute
Si de spui vrute - nevrute
Si nu ții vată-n urechi
Ne ajunge Noul An
Ce-i frumos şi cuelan
La anul şi la mulți ani!

ZIUA BARBATULUI

8 Aprilie 1981

Mult onorați bărbați, distins auditor!
La festival când vine, tot omul e dator
S-asculte, înainte de partea amuzantă
O conferință lungă şi foarte importantă.
Si ca să nu planeze asupră-mi toată vina
C-am neglijat programul -
Sunt gata să vă țin, un ceas şi jumătate,
O conferință gravă de specialitate.
Cum, nu vă pare bine? De ce v-ați întristat?
Mai aşteptați o clipă, că nu am terminat.
Pe de-altă parte însă, găsind că-i anormal
Cu voia dumneavoastră ne-abatem de la modă
Si-n loc de conferință, veți asculta…
o odă!
Odă bărbaților: Inchinare!
Mărire vouă! Glasuri şi imnuri de urare
Străbate-vor văzduhul gătit de sărbătoare!
Si firea picura-va din larg de zări albastre
Belşugul de orgoliu pe sufletele Voastre!
Prea onorați bărbați, distins auditor!
Subiectul conferinței e-atât de-ngrozitor
Că biata-mi Muză, albă de spaimă şi uimire
Când i-am cerut concursul, în loc să mă inspire
S-a dat pe lângă uşă, a pretextat ceva
Si-a dispărut... adio! M-a părăsit aşa
Cu călimara plină de noapte şi de proză -
E vorba deci, aice şi…. de-ateroscleroză!
Iar dacă vă plac viața şi soarele, atunci
E bine să respectați aceste vechi porunci
Pe care medicii de-un veac vi le prescriu-
Iar dumnealor se fac mereu că nu le ştiu:
Să nu stai toată ziua vârât cu nasu-n scripte.
Iar laptele şi carnea să fie bine fripte.
In orice alimente şi-n orice băutură
Să puneți acid fenic nu mult: o picătură ...
Si cel puțin o dată la două săptămâni
Tot omul să se spele pe față şi pe mâini!
Răreşte-o cu tutunul, mai lasă băutura! ...
Evită surmenajul şi orice fel de-abuz
De nu vrei ca la urmă să te trezeşti mofluz!
Si-acum spre îndestulare
Vom servi la fiecare
O scurtă…. caracterizare!
Pentru toți bărbații
De când au apărut bărbații
De-atunci există-n lume atâtea lucruri bune:
Otrava, dinamita, revolverul şi tutunul -
De-atunci există-n lume alcoolul şi tutunul!
Profesorului Nicolae Simionescu
De dimineață până seara
Acelaşi om neobosit,
Adună-n file şi-n imagini
Treptat, tot ce-a descoperit.
Si stăruind în cercetarea
Acestui tainic univers,
Descoperi şi sărbătoarea
Acelor de-acelaşi sex!
Dr.C.Neacşu - cercetător şi filozof
Două muze ai matale
Strălucite şi egale!
Jos-un colț de "cugetare"
Sus refugiu-n cercetare!
Lui Anton Hillebrand
Intinde brațul ... şi, din cuşcă
Incet să iasă ca din pălărie
Si iepuraşi, şi hamsteri care muşcă
Si şoricei ... Curat menajerie!
Celor de la Culturi celulare
Pe "cultură" preț se pune
Iar voi doi vă străduiți
Ca în lume să se ştie
Că celule înmulțiți!
Lui Aurelian Radu
Afară-i vânt şi e-nnorat
Si noaptea e târzie
Cercetătorii au plecat ...
Doar tu, cu insomnie,
Stai tot la microscop lucrând ...
Iar zorile te prind curând
Tot la celule cugetând!
Lui Florin Lupu
Avem şi-un lup la sindicat
A-nghețat, a fracturat,
Nici o oaie n-a mâncat
Si pe toți i-a ajutat!
Lui Dan Predescu
Păzea! Păzea că trece-n goană
Aleargă,
Vâjâie ca vântul
Iar dacă nu te dai deoparte
Te face una cu pamântul!
Păzea că e iresponsabil!
El are flăcări în artere
Si te păleşte fără veste
Cu 40 de cai putere!
Lui Serban Taşcă
Cobori în jos, Serbane, blând,
Tu şaua părăseşte,
Si prinde şoarecii pe rând
De coadă-i învârteşte!
Lui Mircea Leabu
Fă-mă mamă bun şi tare
Si m-aruncă-n cercetare!

Fă-mă mamă snop de tei
Si m-aruncă-ntre femei!
Lui Mugurel Badea
Talentul nostru-n adevăr
Se mărgineşte doar la păr
Dar toată strălucirea ta
Nu stă-n chelie, ci sub ea!
Ing.Petrescu
Iar când a fost de s-a'mplinit
Si, ZEM-ul nostru a murit
Ne-ai spus: Salvarea tuturor
Va fi un aparat de zbor.
Scot pompa de la avion
Si o montez în ZEM-ul mort
Salvez astfel un milion
Si-l folosesc şi la transport.
N.Ghinea
In grădina cu multe flori
Mici şi mari în cinci culori
Apare un hrean distrugător.
Pe locul florilor se aşează
Pentru o biată peroxidază
Iată-l pe Ghinea cum creează.
Electricienilor
Avem noi în dotare
Si doi electricieni
Băieți buni fiecare
Buni matematicieni.
In timp ce unul încă
Mai umblă pe la şcoli
Celălalt şi-adună pruncii
Că-i tată de trei ori ...
Soferului
In mână ține un covrig
Si-aleargă unde-i cerem,
De e caniculă sau frig
El merge cu plăcere!
Lui Nicolae Manea
Te-ai ivit acum pe uşă
Spaima-intârziaților.

Fiindcă iei întâi de toate
Condica fârtaților!
Apoi te duci mai departe,
Străbătând culoarele,
Rugându-i pe toți în parte
Să respecte orarele!
Gabi Popescu
Un Moş Gerilă tinerel
Si blând la chip şi subțirel
Si vesel ca un cintezoi
E-aicea, printre noi!
Eugen Preoteasa
Un orologiu sună 9 jumătate ...
La poarta-mi cea mare oare cine bate?
Tu eşti Eugene? - fiul meu iubit,
Tu, ce-n microvase te-ai împotmolit!
Ai idei mărețe, practica-i mai grea,
Dar cu muncă multă, o faci şi pe ea.
Lucian Ghițescu
Ai plecat în exploatarea unor semne de-ntrebare
Cu vezicule şi pituri; dar, vai! şoricelul mort
L-ai lăsat să zacă bietul, ca să scoți de prin sertare
Hârtii şi comenzi şi prețuri, prăfuite-n aşteptare
Aparate din dotare, aruncate la-ntâmplare
De onor. TEHNOIMPORT.
Lui Virgil Mureşan
De-ai fi făcut armata la marină
Ai fi fost de-acum un dezertor;
Ai fi zburat pe apa cristalină
Cu nava deturnată, spre depărtat decor
Să urmăreşti feroce micuța ta jivină
Cu nume de potcoavă; şi ca un toreador
Să-nfigi tridentul vajnic; cu glasul tău sonor
S-o obligi să-ți dăruiască dorita ta lectină.
Si-acum, poftiți cu toți la masă,
Putea fi mai copioasă.
Consumați cu cumpătare
Nu vă-nfigeți la mâncare!
Tine-ți minte:
Colesterolul e-o otravă
Nu cumva să-l consumați.
Zahărul, şi el te-atacă,
Cu grăsimi vă terminați,
Legumele au vitamine
Dar în oală când le pui
Se transformă-celuloză
Si ți-ai mai bătut un cui!
Si acum, luați aminte deci
Mai bine muriți de foame
Dar cu arterele întregi!

Al doilea Simpozion România - SUA, August 1983

You should always remember how much depends on the quality of your work.
For what you have already done you have my full admiration;
for the future you have my very best wishes,
George E. Palade

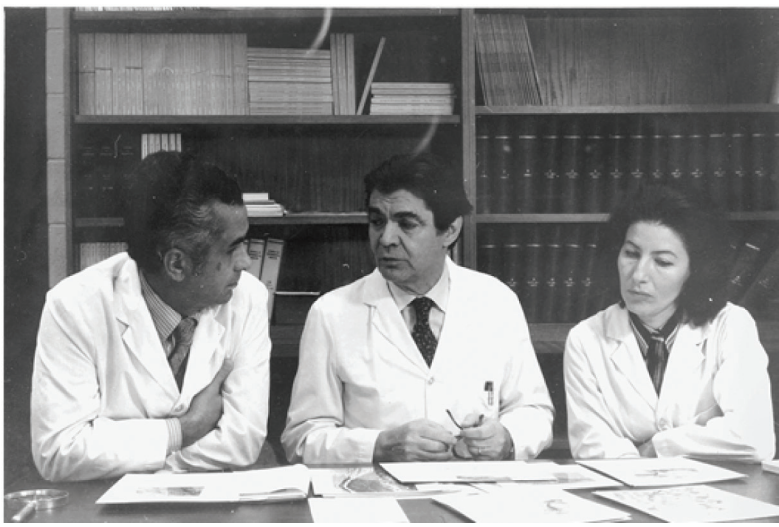
Prof. Marilyn Farquhar
Universitatea Yale,
New Haven, SUA
1983

Pentru toţi membrii institutului – ulţumiri pline de recunoştinţă pentru splendida voastră ospitalitate. Am fost foarte impresionată de progresele voastre ştiinţifice remarcabile înregistrate de la prima mea vizită, acum patru ani. Perseveraţi în muncă, nu vă pierdeţi entuziasmul pentru că în mod cert dă rezultate. Incă odată, mulţumirile şi admiraţia mea.

8/27/83
To All the Members of the Institute –
Grateful thanks for your splendid hospitality. I was truly impressed with your remarkable progress since we first met four years ago. Just keep up your hard work and enthusiasm because it is certainly working.
Again, my appreciation and admiration –
Marilyn Farquhar

Prof. George E. Palade
Laureat al Premiului Nobel
Universitatea Yale, New Haven, SUA
1983

Totdeauna trebuie să vă amintiţi cât de mult depinde totul de calitatea muncii voastre. Pentru ceea ce aţi făcut deja aveţi admiraţia mea deplină; pentru viitor aveţi urările mele cele mai bune.



Roger Kirck,
Ambasador al
Statelor Unite ale Americii
17 iunie 1987

Cu mare admirație pentru munca profesorilor Simionescu, pentru semnificația ei în medicină, pentru înțelegerea între oameni, pentru prestigiul țării lor, pentru pregătirea studenților şi bunăstarea tuturor acelora care au o inimă în piept. Le doresc succes continuu în tot ceea ce întreprind.

With great admiration for the work the Simionescus are doing, and for its significance for medicine, for good understanding between peoples, for the prestige of his country, the training of his students, and the welfare of all of us with a heart. I wish them continued success in every endeavor.

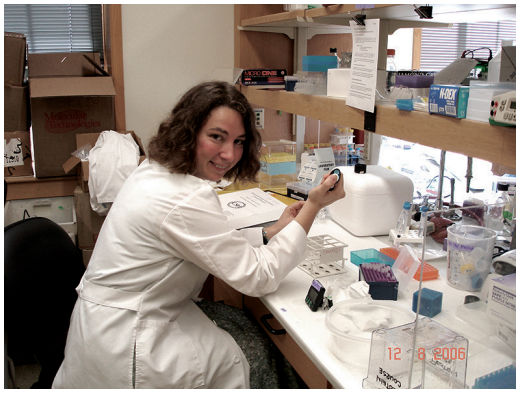
Roger Kirk
Ambassador of the USA
June 17, 1987

Poem scris de Prof. Moris Karnovsky cu ocazia celui de al doilea Simpozion România - SUA, August 1983

A poem for Maya and Nicolai on the occasion of
the Workshop on the Biology of the Vessel Wall
Banquet 8/25/83
Many miles we did fly
To visit Maya and Nicolai,
We came from places far away
As Australia & the USA.
And at this unique Institute
With admiration were struck mute.
If Harvard my labs ever renovate
in effect,
Nicolai will be my consulting
architect.
Of talks we had nothing but the best,
And by the posters were most impressed.
First I learnt that if I
mispronounce Simionescu
Guido Majno would come rushing to my rescue.
So I will not try, & in
affection call them Maya and Nicolai.
We also heard that a violin string,
Was a basement membrane, or some such thing.
Majno showed novel observations
On smooth muscle herniations,
Maya's elegant microdomains
A lot of physiology explains,
Folkman may have the answer
To a future cure for cancer.
Of my own work I'll not speak
But I'm pleased junctions may have sprung a leak!
Haulica's renin, extra-renal
To even in the pineal,
Curry's talk most efficient
Made easy reflection on reflection coefficient.
The b.m. architecture glomerular
Was beautifully expounded by Farquhar,

Grotendorst in his talk,
And when they really get into the act
They can even chemotact.
Nicolai had lots to tell
Of new pathways for LDL,
This news he did boldly assert
Even though he wore no shirt!
Steinberg gave a witty catechism
On lipoprotein catabolism,
Joris showed that athero in the rat
Told something new, & not old hat.
Velican did on us impress
How athero in man doth progress.
Now it's hard to know how to follow,
Since Bob, Nick & George speak tomorrow!
However I will try
And will end – by – and – by.
Wissler will make a novel synthesis
To give our thinking new impetus.
Kefalides'virus will take a bite
And give endothelium a fright,
Palade will show us where we are
And what should be our guiding star.
Gabbi's music at lunch & dinner
Didn't help to keep us thinner.
I'm sure we'd all like to come back,

But Pepe & Nicolai must get the knack
Of learning how to drive,
So their guests will survive!
You will say I'm no poet,
I must admit that I know it,
And I can tell from your faces,
That I should stop & be in stasis.
But before I do, let me say
We have seen such kindness at play
And it is absolutely unique
To provide such hospitality for a week!
So let us give a standing toast
To our lovely hostess & host,
And say with heartfelt tumult
"Multumesc forte mult!"

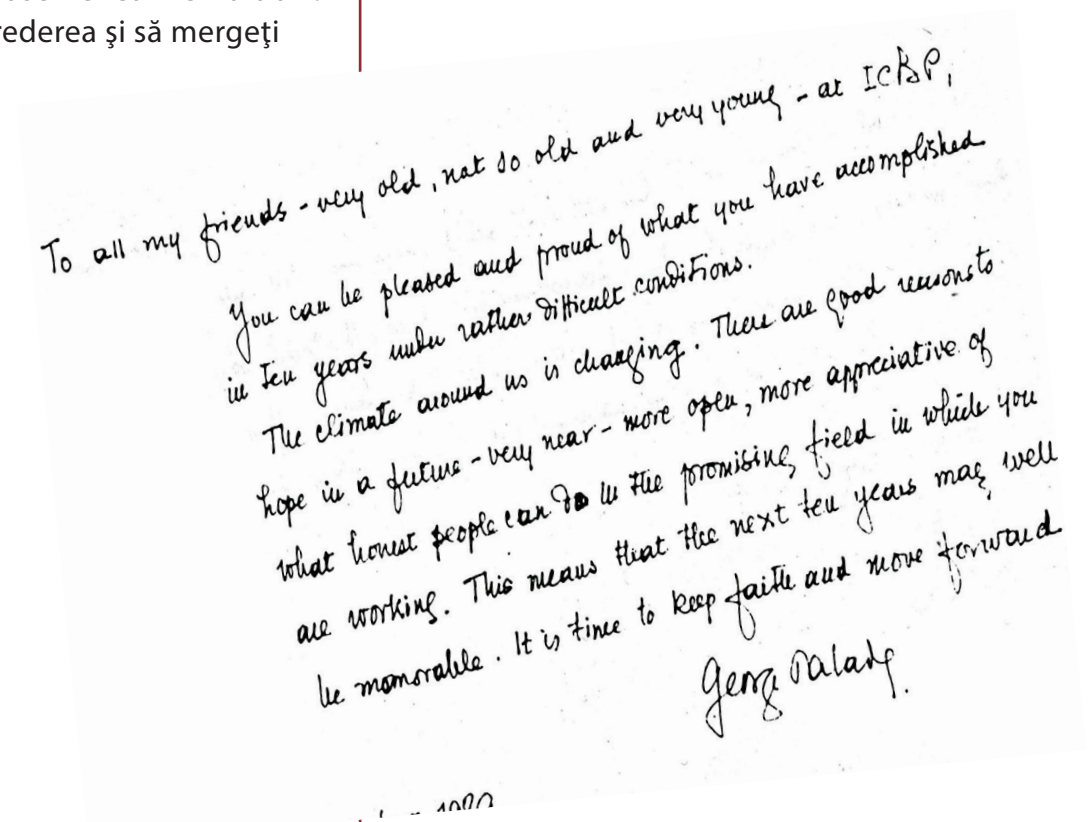


Mesajul Prof. George Palade cu ocazia Simpozionului România - SUA, Septembrie 1989

Prof. George E. Palade
Laureat al Premiului Nobel
Universitatea Yale, New Haven, SUA

Către toţi prietenii mei, foarte vechi, nu atât de vechi şi foarte tineri din IBPC:

Puteţi fi încântaţi şi mândri de ce aţi realizat în zece ani în condiţii foarte dificile. Climatul din jurul nostru se schimbă. Există bune motive să credem într-un viitor – foarte apropiat – mai deschis şi care să aprecieze mai mult ceea ce oamenii oneşti pot face în domeniul promiţător în care lucraţi voi. Asta înseamnă că următorii zece ani vor putea fi de asemenea memorabili. E timpul să păstraţi încrederea şi să mergeţi înainte.
3 septembrie 1989


To all my friends - very old, not so old and very young - at ICBP,

You can be pleased and proud of what you have accomplished in ten years under rather difficult conditions.

The climate around us is changing. There are good reasons to hope in a future - very near - more open, more appreciative of what honest people can do in the promising field in which you are working. This means that the next ten years may well be memorable. It is time to keep faith and move forward

George Palade.

Mesajele Profesorilor Americani cu ocazia Simpozionului România - SUA, Septembrie 1989

Prof. Ramzi Cotran

Profesor şi Chairman , Universitatea Harvard, Boston, SUA şi Preşedintele Societăţii Americane de Patologie

Cu admiraţia mea pentru incredibila voastră ospitalitate şi pentru sejour-ul minunat pe care ni l-aţi oferit aici în Bucureşti. Dar mai mult decât orice, pentru influenţă evidentă pe care voi aţi avut-o şi continuaţi s-o aveţi asupra ştiinţei din România şi pentru contribuţiile voastre consistente la cercetările asupra endoteliului. Nu voi uita această călătorie. Vă mulţumesc şi vă doresc mult succes
Cu afecţiune,

With my admiration for your unbelievable hospitality, and for the wonderful time you gave us here in Bucharest – but most of all for the most significant influence you have had and continue to have in Science in Romania and for your consistent contributions to endothelial research. I will not forget this trip! Thanks and best of luck.

With affection – Ramzi Cotran

Prof. Bryan Brewer, Jr.

Profesor, Directorul Diviziei de Boli Moleculare a NIH Bethesda, SUA

Nicolae şi Maya,

Vă mulţumesc pentru minunata ospitalitate în această săptămână. Va rămâne o foarte memorabilă săptămână în cariera mea ştiinţifică.

Felicitări pentru a zecea aniversare a institutului. In aceşti zece ani voi aţi câştigat o recunoscută reputaţie mondială pentru excelenţă în ştiinţă şi reprezentaţi un model renumit pentru viitorii oameni de ştiinţă români.

Urările mele cele mai bune pentru viitor,

Nicolae + Maya.

Thank you for the wonderful hospitality during the week. It will remain a very memorable week in my scientific career.

Congratulations on the 10th anniversary of the Institute. During the last 10 years you have achieved a world renown reputation for excellence in science and represent an outstanding model for future Romanian Scientist.

All my best in the future

J. Bryan Brewer

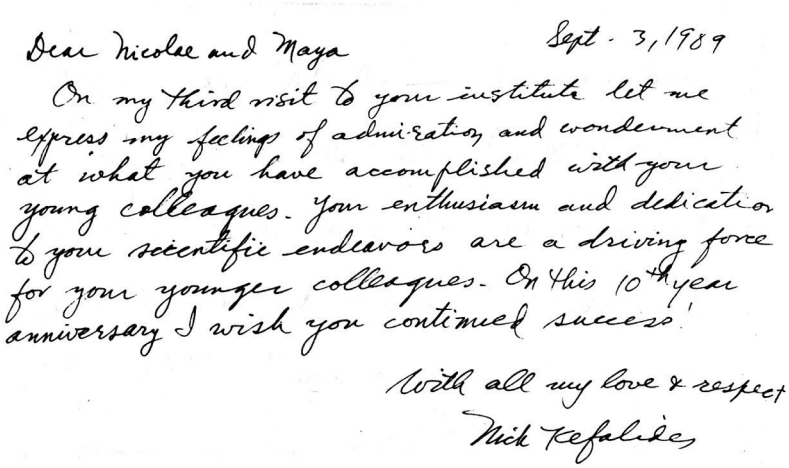
September 1, 1989.

Prof. Nick Kefalides

Profesor la Institutul pentru Studiul Țesutului Conjunctiv, Philadelphia, SUA

Dragă Nicolae şi Maya,

La cea de a treia vizită a mea în institutul vostru daţi-mi voie să-mi exprim sentimentele de admiraţie şi minunare pentru ce aţi realizat cu colegii voştri mai tineri. Entuziasmul şi dăruirea voastră pentru munca ştiinţifică sunt o forţă conducătoare pentru colegii voştri mai tineri. La această a X-a aniversare vă urez un continuu succes.
Cu toată dragostea şi respectul meu,



Dear Nicolae and Maya Sept. 3, 1989

On my third visit to your institute let me express my feelings of admiration and wonderment at what you have accomplished with your young colleagues. Your enthusiasm and dedication to your scientific endeavors are a driving force for your younger colleagues. On this 10th year anniversary I wish you continued success!

With all my love & respect

Nick Kefalides

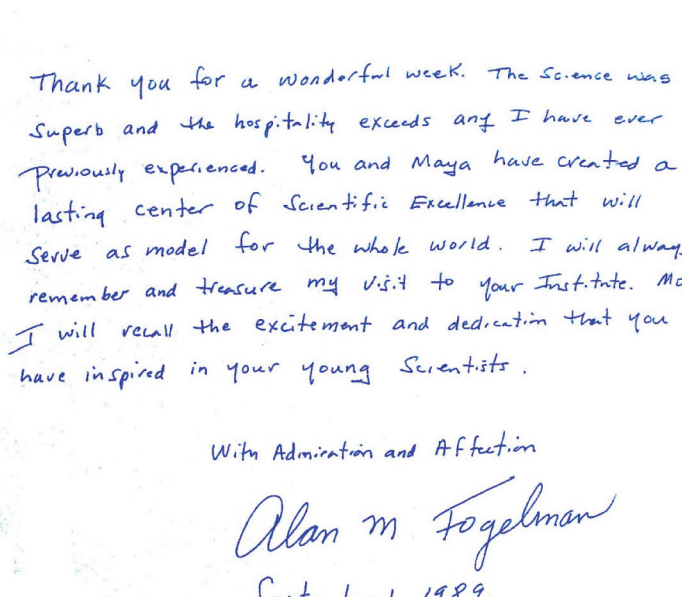
Prof. Alan M. Fogelman

Profesor şi Director al Diviziei de Cardiologie a Universităţii California din Los Angeles, SUA

Vă mulţumesc pentru această săptămână minunată. Ştiinţa a fost superbă, iar ospitalitatea depăşeşte pe oricare am întâlnit-o până acum. Tu şi cu Maya aţi creat un centru durabil de excelenţă în ştiinţă care va servi drept model pentru întreaga lume. Imi voi aminti şi voi preţui pentru totdeauna vizita mea la institutul vostru.

În mod special îmi voi aminti stimularea şi dăruirea pe care aţi inspirat-o tinerilor voştri cercetători.

1 septembrie 1989



Thank you for a wonderful week. The Science was Superb and the hospitality exceeds any I have ever previously experienced. You and Maya have created a lasting center of Scientific Excellence that will serve as model for the whole world. I will always remember and treasure my visit to your Institute. And I will recall the excitement and dedication that you have inspired in your young Scientists.

With Admiration and Affection

Alan M Fogelman

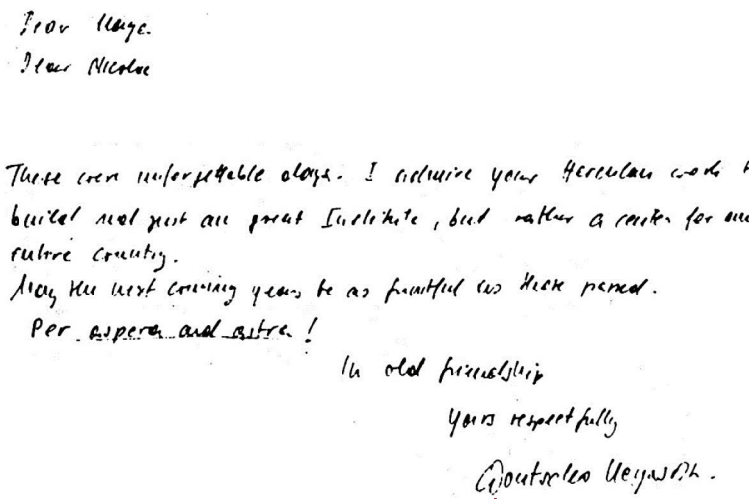
Mesaje cu ocazia Simpozionului România - SUA, Septembrie 1989

Prof. Dontscho Kerjaschki
Profesor, Departamentul de Patologie,
Universitatea din Viena, Austria

Dragă Maya,
Dragă Nicolae,

Au fost zile de neuitat: admir eforturile voastre herculeene de a construi nu numai un mare institut, ci şi un centru de cercetare pentru întreaga ţară.
Fie ca anii care vin să fie la fel de rodnici ca cei care au trecut.
Per aspera ad astra!

În numele unei vechi prietenii,
Cu mult respect,


Dear Maya
Dear Nicolae

These were unforgettable days. I admire your Herculean work t
build not just one great Institute, but rather a center for an
entire country.
May the next coming years be as fruitful as these passed.
Per aspera ad astra!

In old friendship
Yours respectfully
Dontscho Kerjaschki

Comemorarea în IBPC a 100 de ani de la dispariția lui Mihai Eminescu, 1989

1989

INSTITUTUL
DE
BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ

MIHAI EMINESCU
UN SECOL DIN NEMURIRE

ÎN MEMORIAM:
Zoe Dumitrescu-Bușulenga
Mihai Drăgănescu
Ovidiu Maitec
Nicolae Simionescu

LECTURI:
Romulus Dinu, Liana Ionită,
Elena Constantinescu, Felicia Antohe,
Leni Moldovan, Magda State, Flori Chiriţescu

RĂSFRÎNGERI DIN LUMINA LUI:
desene de Nicanor Moldovan

Data: 25 iulie 1989

Ora: 15^{00}

Str. B.P. Hașdeu 8, sectorul 5 București—70646 tel. 160228

EMINESCU

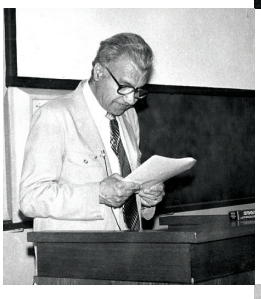
Prof. Nicolae Simionescu:

Pentru orice societate, inclusiv a noastră, progresul depinde de capacitatea de a crea "masa critică" de oameni demni, fermi şi capabili să orânduiască natural scara valorilor, împotriva poluantei non-valori.

O comunitate ştiinţifică care priveşte spre viitor, inclusiv acest mic şi modest institut, este vital interesată nu atât în a redefini "lumea ca ne-lumea" şi nici de a-i separa (aşa cum spune Eminescu) pe "smintiţi şi pe mişei", ci în primul rând în a identifica, promova şi ocroti aceste realităţi care poartă în ele permanenţa spiritului şi geniului creator al poporului nostru.

Asta implică să urâm apatia şi această comemorare este o luptă împotriva apatiei, pentru că aşa cum spunea un celebru gânditor "nepăsarea este treapta cea mai de jos a libertăţii".

N. Simionescu



Mihai Drăgănescu

Zoe Dumitrescu-Buşulenga

IBPC este afiliat Academiei Române - 1990

IBPC – este ales instituție membră a rețelei UNESCO-MCBN

Nicolae Simionescu inițiază pentru prima dată în România - sistemul de granturi la Academia Română -1992

IBPC este câștigătorul și a două granturi FIRCA (NIH) - 1992-1995

1990 / IBPC SI ACADEMIA ROMANA

Primirea Profesorilor Maya Simionescu și Nicolae Simionescu în Academia Română

1994 / ACADEMICIANUL NICOLAE SIMIONESCU ESTE ALES VICE-PREŞEDINTE AL ACADEMIEI ROMÂNE (1994-1995).

Iniţierea **Planului de Acţiuni pentru Îmbunătăţirea Cercetării Ştiinţifice** în Academia Română.

Academicianul Nicolae Simionescu inaugurează în revista "Academica" rubrica intitulată **"Quo Vadis Academia?"**

Alocuţiunea privind **"Contribuţia Academiei Române la protejarea integrităţii mediului"**, cu ocazia adunării festive consacrată "Zilei Mondiale a Mediului", Bucureşti.

1994

Academicianul Nicolae Simionescu inițiază Granturile Academiei Române, finanțare competitivă a cercetării științifice.

Nicolae Simionescu a părăsit această lume, trecând din plină activitate direct în legendă - 1995

IN MEMORIAM
NICOLAE SIMIONESCU
1926 – 1995

Prof. George E. Palade
6 februarie 1995

O exigentă, dar luminoasă viziune asupra viitorului științelor biomedicale în România

Nicolae Simionescu a avut o carieră meteorică.
În zece ani, pornind cu o inteligență sclipitoare şi o educație generală valoroasă a devenit o autoritate deplină şi unanim recunoscută în biologia celulară a endoteliului vascular. În decada următoare şi în continuare, în condiții sociale şi politice nesigure şi dificile, a organizat un institut de cercetare şi a pregătit o întreaga echipă de cercetători capabili, iar în următorii cinci ani şi-a asumat o poziție de conducere în Academia Română, cea mai înaltă instituție care ghidează activitatea de creație a țării. În fiecare etapă în această rapidă evoluție, a lăsat în urmă o moștenire durabilă: - realizările cercetărilor lui științifice, - Institutul de Biologie şi Patologie Celulară - două generații de cercetători bine pregătiți - şi o exigentă dar luminoasă viziune asupra viitorului științelor biologice şi biomedicale în România.

Nicolae Simionescu s-a născut cu darurile necesare unui cercetător în științele biomedicale. Curios și întreprinzător dar, în același timp ordonat și metodic, a investit ani de-a rândul călătorind de la chirurgie la patologia experimentală și la endocrinologie până și-a găsit domeniul potrivit firii și vederilor lui.

L-a găsit la început în biologia celulară a endoteliului vascular pe care a început s-o studieze la Universitatea Rockefeller din New York. Ce i se potrivea în acest domeniu era cercetarea morfologică care trecea, dincolo de forme și documente micrografice de conținut informativ și calitate estetică, la lucru experimental metodic și mereu avansat până la limita posibilului tehnic. ținta lucrului era înțelegerea rostului funcțional al structurilor supra-moleculare recent descoperite în celulele endoteliale. Din această primă parte a activității lui de cercetător la Universitatea Rockefeller și la Universitatea Yale trebuie amintit rolul veziculelor plasmalemale în transcitoză, adică în transportul de proteine și lipoproteine sanguine. Termenul de transcitoză a fost introdus de el în literatura biomedicală. Din aceeași perioadă datează descoperirea canalelor transendoteliale și o serie de alte structuri caracteristice endoteliului vascular.

Cercetător prin vocație dar, medic prin educație și afecțiune, Nicolae Simionescu nu s-a limitat la studiul morfologiei funcționale a endoteliului vascular, ci - mânat de dorința exploratorului medic - a trecut la studiul modificărilor endoteliului și a altor elemente a vaselor sanguine în maladiile cardiovasculare, mai cu seamă în arterioscleroză, cauza dominantă de morbiditate și mortalitate în țările cu economie dezvoltată sau pe cale de dezvoltare. Echipa organizată de el și de Maya Simionescu la București a devenit în scurtă vreme una din sursele de informație avansată, bine cunoscută și respectată în întreaga lume pentru morfologia și biochimia patologică a arteriosclerozei experimentale.

Nicolae Simionescu a fost mereu animat de dorința de a organiza un centru de cercetare în România pentru a menține în viață interesul pentru cercetarea științifică printre studenții și doctoranzii din țară. A investit nebănuit de mult timp ca să pună la punct planurile de construcție și de dotare a unui nou Institut de biologie și patologie celulară la București, ca să organizeze activitatea Institutului și ca să asigure un program de colaborare continuă cu laboratoarele de cercetare din Statele Unite. Era începutul unei aventuri îndrăznețe și aproape improbabile care merita totuși să fie întreprinsă ca să contracareze efectele izolării impuse de condițiile politice din acei ani și ca să arate românilor că nu sunt uitați.

Nicolae Simionescu a fost un maestru constructor talentat și clar-văzător. A construit un institut de cercetare și o echipă de lucru de mare calitate. A fondat Societatea Română de Biologie Celulară; a devenit vicepreședinte al Academiei Române și a contribuit din plin la organizarea unui sistem competitiv de subvenții de cercetare. S-a stins, din nefericire, înainte de vreme când viziunea lui optimistă și forța lui de lucru erau pe punctul să marcheze începutul unei noi ere pentru cercetarea științifică din România.

Memoria lui poate fi onorată numai prin continuarea operei lui la Academie, la Societatea Română de Biologie Celulară ca și la Institutul de Biologie și Patologie Celulară din București.

Prof. Guido Majno
Professor University of Massachusetts

The American Journal of Pathology
Iulie 1995

Dispariția lui Nicolae Simionescu, care ne-a părăsit la 6 februarie 1995, este o mare lovitură nu numai pentru România, dar și pentru biologia și patologia celulară, precum și pentru luptătorii pentru libertate din lumea întreagă. Nicolae Simionescu a fost unic în multe privințe, inclusiv prin faptul că numele de familie era folosit la plural deoarece și-a împărtășit cariera științifică cu neprețuita sa soție, Maya. Printre distincțiile care le-au fost conferite se numără și Medalia Rokitansky, acordată de Academia Internațională de Patologie în anul 1986.

"Simioneștii" au devenit specialiștii de frunte ai lumii în domeniul endoteliului, preluând făclia de la eminentul român laureat al Premiului Nobel, George Palade. După 10 ani de activitate alături de Palade, ei au hotărât să revină în România, în ciuda incredibilelor dificultăți care trebuiau înfruntate în țară sub dictatura unui paranoic, pentru a da o speranța tinerilor cercetători români. Institutul de Biologie și Patologie Celulară (IBPC) a fost pentru un timp singurul institut de după Cortina de Fier care a primit subvenții de la NIH, guvernul român neasigurând decât fondurile pentru salarizarea a 150 de angajați, nu și pentru cercetare.

Activitatea în IBPC s-a concentrat în întregime asupra biologiei și patologiei endoteliului, institutul devenind o adevărată insulă nu numai în ceea ce privește cercetarea științifică avansată, dar și a libertății și culturii. Semnificativ este faptul că, de-a lungul a 10 ani, nici unul dintre tinerii români trimiși la specializare în laboratoare de prestigiu din lume nu a rămas în străinătate, așa după cum s-a arătat într-un recent articol din revista Nature (362:605,1994). Nicolae Simionescu a hotărât să nu se încline în fața dictatorului, riscându-și în permanența propria existență. În IBPC, limba engleză reprezenta limba de lucru în activitatea științifică și se sărbătorea Crăciunul, ca să menționăm doar două dintre aspectele care ar fi putut determina guvernul român să-l acuze pe Nicolae Simionescu de spionaj în favoarea Statelor Unite. Revoluția a venit la momentul potrivit.

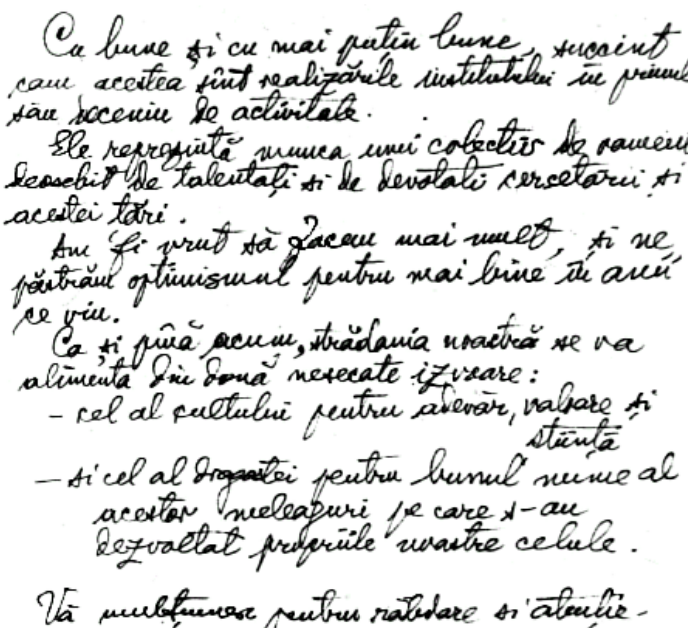
Testamentul științific al lui Nicolae Simionescu, cuprinde printre altele, adoptarea conceptului de transport transendotelial propus de Palade, pe care l-a generalizat și pentru care a introdus termenul de transcitoză, devenit astăzi un termen biologic clasic. Printre celelalte realizări științifice ale colectivului condus de Simionescu se pot număra: 1) identificarea leziunilor primare aterosclerotice ca acumulări subendoteliale de lipozomi proveniți din lipoproteinele transcitate, observație publicată în această revistă în 1986; 2) evidențierea faptului că endoteliu prezintă receptori specifici pentru albumină, care este apoi transcitată în subendoteliu, o descoperire care a fost salutată că fiind cea mai importantă în fiziologia microvasculară de la emiterea ipotezei lui Starling, și 3) descoperirea existenței unor diferențe majore la nivelul celulelor endoteliale, inclusiv faptul că există o mare concentrare a receptorilor pentru histamină în venule (un domeniu de mare interes pentru fiziologi). Și ca expresie a celei mai mari considerații, IBPC poartă astăzi numele lui Nicolae Simionescu.

Dr. Anca V. Sima
IBPC-NS

În Februarie 1995, domnul nostru Profesor a plecat din plină activitate direct în legendă.

Grijuliu cu educarea tinerilor săi colaboratori, Domnul Profesor ne-a adus încă de la inaugurarea IBPC zâne bune, care să insufle harul științific: laureații Premiului Nobel pentru medicină George Emil Palade și Christian de Duve, precum și un viitor laureat Nobel al anului 1999, Gunther Blobel.
În anii grei prin care a trecut echipa IBPC, alături de întreaga țară, Domnul Profesor ne-a fost călăuză și pavăză: ne-a învățat să muncim cu pasiune și dăruire, să ne bucurăm din tot sufletul, fără opreliști și ne-a învăluit pe toți în dragostea sa. Cuvintele spuse la aniversarea a 10 ani de la înființarea IBPC ne-au rămas în inimă la toți:

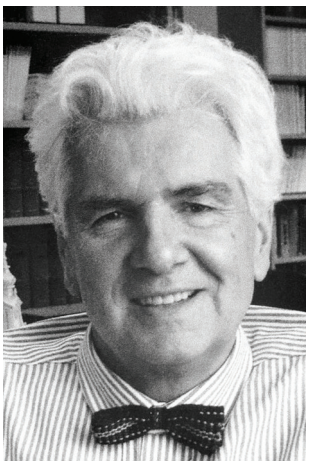
Vă mulțumim și noi, Domnule Profesor!

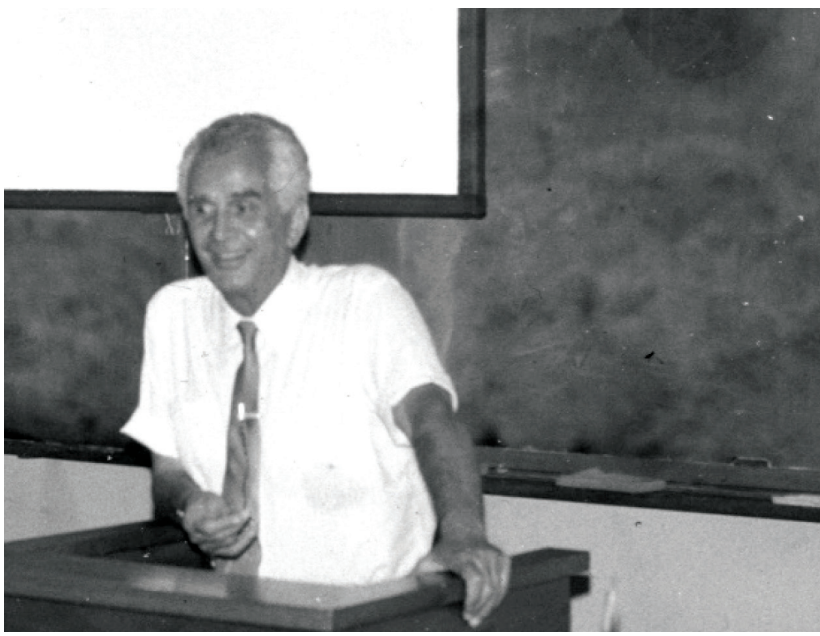

Ca bune și cu mai puțin bune, succesul care acestea sînt realizările institutului în primul său deceniu de activitate.
Ele reprezintă munca unui colectiv de oameni deosebit de talentați și de devotați cercetării și acestei țări.
Am fi vrut să facem mai mult, și ne păstrăm optimismul pentru mai bine în anii ce vin.
Ca și pînă acum, străduința noastră se va alimenta din două nesecate izvoare:
- cel al cultului pentru adevăr, valoare și știință
- și cel al dragostei pentru bunul nume al acestor meleaguri pe care s-au dezvoltat prefețile noastre celule.

Vă mulțumesc pentru răbdare și atenție.

Profesor Günter Blobel,
Nobel Prize Laureat
Rockefeller University, USA

Nicolae a menținut știința Românească pe harta lumii în anii întunecați ai dictaturii comuniste și a fost cea mai mare speranță a Științei Românești în era postcomunistă. Optimismul și curajul lui în fața adversităților era însuflețitor. Realizările sale științifice sunt remarcabile. A fost un profesor minunat și o sursă de inspirație pentru generații de tineri cercetători din România și din alte părți ale lumii.

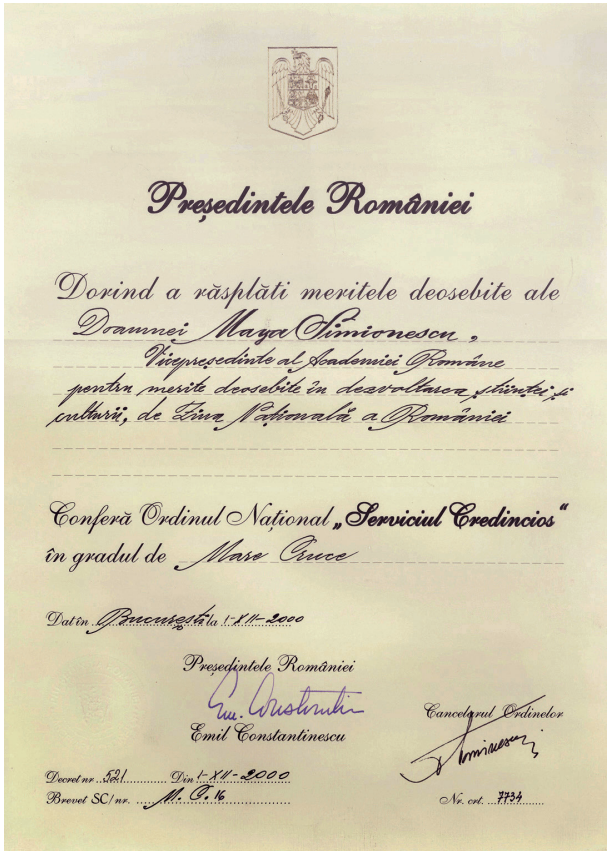




Prof. RADU DEAC

De ce simțim așa de acut dispariția profesorului Nicolae Simionescu? În primul rând pentru modelul de om profesionist, de intelectual. Să nu mai amintim de profesionalitatea și farmecul profesorului Simionescu. Pentru, așa cum spunea profesorul Guido Majno, pentru eroismul de a se întoarce pe aceste meleaguri dintr-o țară în care avea aproape tot ce și-ar fi dorit cineva și care i-a recunoscut din plin valoarea. Simțim profund această dipariție pentru faptul că instituția pe care a creat-o, școala, reprezintă într-adevăr ca cea mai durabilă instituție dintr-o societate cu un etalon și un standard nemaiîntâlnit la noi. Resimțim această dispariție pentru verticalitatea omului care a îndrăznit, în vremuri în care niciunul dintre noi nu îndrăznea să spună acele adevăruri. De asemenea, resimțim acut această dispariție pentru faptul că profesorul Simionescu ne-a învățat să prețuim valoarea în știință, în artă sau în literatură și nu în ultimul rând, pentru faptul că ne-a deschis calea către un nou tip de cercetare, nou pentru această țară dar mai ales nou prin ea însăși pentru că distila o viață de om, de morfolog, de fiziolog, de chirurg chiar, și ce școală de viață și de muncă este această chirurgie și iarăși nu în ultimul rînd faptul că a dedicat o viață cercetării fundamentale pentru a elucida probleme încă neabordate și cu tehnici neabordate.

Iată deci un model, un om, o instituție, o școală și pentru că toate acestea trebuiau să poarte un nume, un singur nume, i s-a spus "Nicolae Simionescu", Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu". Această instituție va dăinui peste veacuri amintind de ctitorul ei, de acea lumină care a fost la începutul acestei mărețe întreprinderi. Dacă există o ironie în știință atunci cu siguranță aceasta este faptul că endoteliul acela pe care profesorul l-a studiat mai bine decât oricine este și acela care l-a răpus, probabil datorită faptului că a smuls în acest domeniu naturii mai mult decât ar fi trebuit să o facă. De la dispariția profesorului Simionescu avem totuși mângâierea că Dna profesor Maya Simionescu, cea cu care s-au împletit idealurile, visurile și împlinirile sale, este alături de noi și avem certitudinea că va continua toate aceste visuri și idealuri făcându-le să se împlinească și mai mult. Vom fi cu siguranță alături de dânsa pentru a cinsti memoria profesorului Nicolae Simionescu. Eu personal am un motiv în plus de mângâiere, acela că este alături de mine sau sunt alături de mine Dan și Agneta Simionescu care fără îndoială poartă ceva din filonul de aur al profesorului Nicolae Simionescu. De asemenea trebuie să mărturisesc că port povara, ca exponent al chirurgiei cardiovasculare, că tot ce știm și am învățat n-am putut să oferim profesorului Simionescu pentru a fi și astăzi sau poate mulți ani de acum împreună cu noi. În ce măsură această remarcabilă instituție, pe care profesorul Simionescu a creat-o, a smuls naturii acele secrete foarte bine protejate în patologia cardiovasculară vom vedea în partea a doua a acestei sesiuni în care vor fi prezentate concepția institutului și a profesorului Nicolae Simionescu despre aterogeneză.



Președintele României

Dorind a răsplăti meritele deosebite ale
Doamnei Maya Simionescu,
Vicepreședinte al Academiei Române
pentru merite deosebite în dezvoltarea științei și
culturii, de Ziua Națională a României

Conferă Ordinul Național „Serviciul Credincios"
în gradul de Mare Cruce

Dat în București la 1-XII-2000

Președintele României
Emil Constantinescu

Cancelarul Ordinelor

Decret nr. 521 Din 1-XII-2000
Brevet SC/nr. M. O. 16
Nr. crt. 7734

ACAD. MAYA SIMIONESCU
IN 1995 DEVINE DIRECTOR AL IBPC-NS,
VICEPREȘEDINTE AL ACADEMIEI ROMANE
(1998-2006)

Din IBPC-NS au fost aleși trei noi membri ai Academiei Române
(acad. Doina Popov, acad. Anca V. Sima, dr. Ileana Mânduțeanu,m.c.)

Academia Română la140 de ani;
Sesiune comună Academia Română - Institutul Franței

Bootstrapping a new institute

Alison Abbott

The jewel in the crown of the Romanian Academy is the Institute of Cellular Biology and Pathology, run by the husband-and-wife team, Nicolae and Maya Simionescu .....

A thriving centre, with 130 staff, 50 of them scientists who have mostly worked abroad. The institute is one of the very few in Romania performing world-class research. It concentrates its efforts on the molecular and cell biology of the cardiovascular system, with particular reference to atherosclerosis.

The centre did not attain this position easily. Its present status is entirely the product of the determination of its director to provide a haven for good science in his home country, despite the almost impossible political situation. Nicolae Simionescu made his escape from Romania in 1970 when, after a year-long struggle, he got a visa to visit the United States. He spent the next three years as a research fellow at the Rockefeller University and then moved to Yale, where he eventually became a professor. Despite his success across the Atlantic, Simionescu always wanted to return home to help make it possible to do good research work in Romania. In 1972, he sent the government a proposal for the building of an institute of cell biology, in which there were virtually no studies anywhere in Romania. His association with George Palade, a Nobel prizewinner and Romanian expatriate, helped his cause; the following year, the government approved the proposal in principle.

Simionescu agreed to return to run the institute under certain very strict conditions, the most important being that he would be allowed to spend a part of each year in the United States, and that he would be able to send his young scientific staff there for training. After numerous delays, during which decisions were repeatedly made and unmade, the institute, reasonably equipped, finally came into being in 1979. The Simionescus came home. But they were immediately told by the Ministry for Health and Education that funds had run out. The institute would receive funds only for salaries and maintenance costs. For the succeeding decade, the Simionescus survived on substantial grants from the United States – for a time, they were the only institute in eastern Europe to hold grants from the US National Institutes of Health, and brought vast shipments of equipment and journals back with them from their annual visits to the United States. Customs records show that, between 1979 and 1992, they transported 14,000 kg or material, worth 33,000 US$.

In addition, Simionescu managed to send 14 young scientists to work in laboratories in the United States during the 1980s. Surprisingly, none defected: all returned to form the core staff on the institute.

The Simionescus established a number of traditions in their institute during the 1908s, in defiance of the government. One was to require all scientists to give regular progress reports of their projects in English, to ensure that language did not become a scientific barrier. They also held US-Romanian scientific

workshops, bringing in US scientists, using US money. The Simionescus have sought to nurture a broader appreciation of culture. They play taped classical music concerts in the common-room with information sheets about the composer taped to the tables, and have used their auditorium to hold cultural, and well scientific, events. They celebrate Christmas, complete with Christmas tree and Santa Claus for the staff and their children.

These actions were regarded by the old regime as provocative, but they were tolerated. But as time went out, the institute began to be regarded with more and more suspicion by Ceausescu, culminating in his declaration in September 1989, at the height of his paranoia, that Simionescu was a US spy, selling Romania's scientific secrets. His Visa, needed to allow him to complete his autumn lectures at Yale, where he was still a visiting professor, was withdrawn. After pressure from US scientists and the US embassy, he was belated allowed to go. "It was a very scary time", he remembers, thinking it would be his last trip. But when he returned in January 1989, the revolution had changed everything.

There can be no comparison between conditions now and then, says Simionescu, even though the present is very far from ideal. Funds are now decreasing, not increasing. And although there is now complete freedom to travel, as often as not the young scientists who continue to be sent abroad for training no longer return. Indeed, some of those who resisted the temptation to defect during their periods abroad in the 1980s, now want to leave. "They do not complain that they cannot do good research here", says Simionescu. "It is mostly because the salaries are too low."

The Simionescus remain undaunted. Their strategy is to keep training new people, even if the returns are now likely to be lower.

Dedicația Prof. Samuel Silverstein pe cartea "Elis Island"

Samuel Silverstein

Profesor, Columbia University, New York
12 December 1992

To Nicolae and Maya,

We visited Ellis Island shortly after you arrived in New York this fall. As we walked the halls of the Immigration Museum, viewed the photographs, and thought of the aspirations of the people who had left Eastern Europe to escape totalitarian regimes, I could not help but think of the two of you and of your courage in maintaining liberal thought, personal dignity, freedom of inquiry, and the spirit of creativity at your Institute in Bucharest for more than a decade despite Ceausescu's totalitarian regime. You too could have left for an easier life in the United States. But you choose a much more difficult challenge. I respect your choice and admire you for it. In saying this I am reminded of Adlai Stevenson's remarks in appreciation of Eleanor Roosevelt "She would rather light a candle than curse the darkness" he said of her. You have not only lit a candle, but you continue to nourish and treasure it.

With good wishes,
Sam and Jo Ann

1996 – 2008

Centrul de Excelență al Academiei Române - 1999

Centrul de Excelență al Comunității Europene - 2000

Proiectul SERA "Consolidarea Spațiului European de Cercetare prin Consolidarea Competenței de Cercetare din România în genomică și proteomică a principalelor boli globale de risc: Ateroscleroza, diabetul și complicațiile acestuia", Director de proiect: Maya Simionescu - 2005.

În cadrul Proiectului SERA (2005-2008), IBPC-NS a organizat 14 Simpozioane naționale și internaționale, a găzduit 113 vizite ale unor cercetători din Europa și SUA, iar 83 dintre cercetătorii IBPC-NS au participat la congrese internaționale și schimburi între laboratoare.

Simpozion la cea de-a 20-a aniversare a IBPC-NS- 1999

Simpozion la cea de-a 25-a aniversare a IBPC-NS - 2004

Simpozion la cea de-a 30-a aniversare a IBPC - NS - 2009

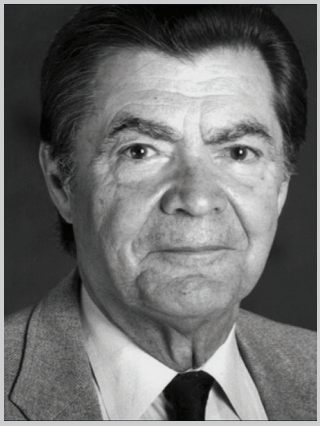
Cursuri postuniversitare de perfecționare cu conferențiari internaționali - Opt ediții

Mesajul Prof. George Palade la a 19-a aniversare a IBPC-NS

1998

"In the late 1970's, Nicolae and Maya Simionescu, at that time Visiting Professors at Yale, conceived the idea of organizing in Romania a research institute in modern cell biology, centered primarily on the organization, function and pathology of the vascular endothelium, a problem, at that time and still today, of major concern in Medicine and public health.

The political climate was not favorable, but the basic idea was that an attempt should be made to put an end to the period of quasi-complete isolation of Romanian scientists from the rest of the world. The basic assumption was that political regimes, irrespective of what they believe, have a much shorter life span than the national community and that whenever possible that community in which they function should be brought back into the mainstream of the creative scientific activities of the rest of the world. So, I decided to help this courageous venture. The project developed slowly. It embodied an official collaboration between the University of Bucharest and the faculty of Medicine at Yale, and it involved the training of a relatively large group of young Romanian investigators abroad.



It was the vision and unrelenting dedication of Nicolae Simionescu, Maya Simionescu
who were supported by colleagues, that transformed that dream into reality, inaugurated as the Institute of Cellular Biology and Pathology, 19 years ago.

The judicious choice of the chosen field of research ensured the success of the enterprise and the Institute soon became known for the high-quality and the incisiveness of the research activities of its staff. In its short history, many adverse events, none more threatening than the untimely death of Nicolae Simionescu buffeted the ICBP. Nonetheless, the staff of the Institute has rallied to the cause and has succeeded in continuing its valid, significant research efforts.

The vision of Nicolae Simionescu has not died. It is, in fact, more alive than ever."

Cuvântul Acad. Nicolae Cajal la a 20-a Aniversare a IBPC-NS - 1999

Academician Nicolae Cajal
Președinte al Academiei de Științe Medicale
Director al Institutului de Virusologie al Academiei Române

Stimate colege și stimați colegi, Doamnelor și Domnilor,
Asistăm astăzi aici, la o sărbătoare a științei, a științei biologice, mai corect, a biomedicinei românești, determinată de cei 20 de ani ce au trecut de la înființarea Institutului de Biologie și Patologie Celulară, Institut realizat prin strădaniile de admirat ale lui Nicolae Simionescu și a Mayei Simionescu. Cea de-a 20 a aniversare a Institutului permite tuturor celor care cunosc activitatea, publicațiile și, aș spune, ecoul lor în ierarhia științifică națională și internațională să mulțumească cu recunoștință creatorilor acestui minunat Institut din care din păcate, unul din creatori a trecut în eternitate, și să mulțumească tuturor celor care au trudit și trudesc în laboratoarele sale pentru evoluția ascendentă a contribuțiilor lor originale și care au permis și permit afirmarea cu tărie a existenței unei mari și prestigioase școli, aș numi-o școala "școala Simionescu". De altfel, Institutul sărbătorit poartă cu cinste de câțiva ani numele regretatului Academician Prof. Nicolae Simionescu, nu numai ctitor, dar o personalitate ce s-a impus mulți ani în domeniile fiziologiei, endocrinologiei și mai ales a biologiei celulare și moleculare românești și nu numai românești, ci mondiale.

Acad. Maya Simionescu, ca să revin, una din fondatori, actualul Director al Institutului, la rândul ei o mare personalitate, cu contribuții remarcabile în domeniu, a prezentat astăzi aici, remarcabil ca model, contribuțiile Institutului, contribuțiile de excepție ale acestei minunate școli de cercetare și a creionat programe de viitor, moderne, îndrăznețe și totuși, cred, realiste.
Iată de ce nu-mi voi permite să răpesc cu alte comentarii, din timpul dumneavoastră de lucru, atât de prețios și voi încheia cu dorința, cu privilegiul pe care îl am, ca în numele Secției de Științe Medicale din Academia Română, în numele conducerii Academiei de Științe Medicale și al Institutului de Virusologie al Academiei Române, Institut frate mai bătrân, care anul acesta sărbătorește 50 de ani de activitate, să vă transmit din inimă, felicitări deosebite, aprecieri pentru tot ce ați realizat timp de 20 de ani, o operă științifică și de educație de mare răsunet, punct de plecare, cu siguranță, pentru noi și mari succese, pe care vi le doresc din inimă și le dorim cu toții din tot sufletul. Mulți ani înainte fericiți și cu succes.

Cuvântul Acad. Radu Voinea la a 20-a Aniversare a IBPC-NS - 1999

1999

Academician Radu Voinea
Președinte al Secției de Științe Tehnice al Academiei Române

Domnule Președinte al Academiei Române,
Stimați colegi, Doamnelor și Domnilor,

Doresc, în primul rând, să vă mulțumesc pentru invitația ce mi-a fost adresată de a participa la Sesiunea Științifică Aniversară - Institutul de Biologie și Patologie Celulară "N. Simionescu" , 20 de ani - și să vă mărturisesc cât de bine mă simt astăzi și ori de câte ori mă aflu în mijlocul acestui harnic colectiv care activează în Institut și care se bucură de un bine-meritat prestigiu în țară și peste hotare. Cu 20 de ani în urmă, Profesorul Nicolae Simionescu și soția sa Maya Simionescu, care visaseră demult un asemenea Institut, s-au străduit să transforme visul în realitate. și nu le-a fost deloc ușor. Dar în cele din urmă au reușit, punând într-însul mult suflet. Suflet din sufletul lor. Din păcate soarta nemiloasă l-a răpit prematur pe distinsul Academician Nicolae Simionescu, pe atunci Vicepreședinte al Academiei Române și Director al Institutului, lăsând în urma lui un mare gol, greu de împlinit. Dar, potrivit cuvintelor lui Horațiu "Vasul păstrează multă vreme mireasma de care s-a pătruns mai întâi", sperăm ca Institutul de Biologie și Patologie Celulară "N. Simionescu" să păstreze multă vreme mireasma spiritului marelui om de știință care a fost Nicolae Simionescu și al cărui nume îl poartă.

Acum 20 de ani, un vrednic colectiv, format din oameni de știință de o înaltă competență, cu o bogată experiență și din tineri entuziaști, dornici să se afirme, porneau împreună pe un drum nou, nebătătorit încă. Cele două generații au conlucrat excelent, Într-un veritabil spirit de echipă. S-a lucrat mult. S-a lucrat cu pasiune și dăruire, de dimineața până seara, și adesea, până târziu în noapte. S-a lucrat cu plăcere și roadele n-au întârziat să se arate. În întâlniri internaționale de lucru, cercetătorii Institutului au putut constata cu satisfacție că pot purta discuții, practic, vorbind de la egal la egal, cu prestigioase personalități ale biologiei și patologiei celulare mondiale și că rezultatele obținute de ei prezentau interes pentru aceste personalități, fapt care a avut un efect tonic. Le-a dat mai multă încredere în propriile lor forțe și curajul necesar pentru a merge mai departe pe drumul atât de spinos, dar totuși atât de frumos, al cercetării științifice. Fără îndoială, meritul mare al Institutului este acela de a fi dat la iveală noi secrete ale naturii în domeniul biologiei și patologiei celulare, dar tot atât de important mi se pare și faptul că Institutul a devenit o școală în care se formează și se desăvârșesc noi specialiști în acest domeniu. Și când subliniez acest merit, îmi vine fără să vreau, în minte, un vechi proverb chinezesc, potrivit căruia "dacă oferi unui om un pește el se va hrăni o dată, dar dacă îl înveți să pescuiască el se va hrăni întreaga viață".

În încheiere, vă rog să-mi permiteți să urez Doamnei Academician Maya Simionescu, Vicepreședinte al Academiei Române și Directoarea Institutului de Biologie și Patologie Celulară "N. Simionescu", precum și tuturor celor care activează în acest institut, sănătate deplină, tinerețe spirituală, noi și remarcabile succese în descoperirea secretelor vieții, în acest dificilă, dar frumoasă confruntare cu necunoscutul. Fie ca, în spiritul celebrului vers al lui Horațiu "Exegi monumentum aere perennius", rezultatele cercetărilor Institutului să se impună și în viitor pe plan mondial, ca un impresionant monument de știință, în slujba omului, mai durabil decât bronzul.

Vivat, crescat, floreat Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu".

Cuvântul Prof. Leonida Gherasim la a 20-a Aniversare a IBPC-NS - 1999

Profesor Dr. Leonida Gherasim
Spitalul Clinic Universitar - București

Stimată Doamnă Academician Maya Simionescu,
Domnule Președinte,
Doamnelor și domnilor,

În cei 20 de ani de când pionierii și conducătorii Institutului, Profesorul Nicolae Simionescu și Prof. Maya Simionescu, au pus bazele Institutului, ei au intrat și Institutul a intrat în istoria științei, a cardiologiei și a învățământului din țara noastră. Permiteți-mi să explic de ce Institutul a fost și este un exemplu pentru noi toți, foruri academice, științifice și universitare. În primul rând a creat pentru cercetarea medicală și pentru cercetarea biologică un standard sau standarde care au devenit de referință pentru țara noastră. Aceste standarde sunt standardele medicinei și biologiei din Europa și Statele Unite, standarde către care trebuie să tindă cercetarea științifică de pretutindeni. Metodologia lucrărilor Institutului, planificarea cercetării, modul de prezentare în reuniunile științifice, publicațiile din revistele de specialitate, modul de constituire a echipelor de cercetare, cel puțin toate acestea au plasat Institutul într-o poziție de referință pentru medicina noastră și pentru cercetarea științifică de la noi. În al doilea rând aș vrea să subliniez că de la început, conducătorii Institutului și cercetătorii din Institut s-au concentrat pe câteva probleme de biologie și patologie cardiovasculară care au devenit fundamentale și prioritare de abia după 15-20 de ani în cardiologia de astăzi..... În ultimii 5 ani, cardiologia cred că a trecut în era cardiologiei. celulare și moleculare și aceste domenii, altădată rezervate cercetătorului hiperspecializat, au devenit domenii obligatorii pentru cardiologi. Știința înseamnă sigur, nu numai cercetare, înseamnă și anticipare și Institutul a dovedit un spirit de anticipație pentru cardiologie, pentru care trebuie să-i fim recunoscători. Fiziologia și patologia endoteliului vascular care reprezenta un domeniu al inițiaților, în urmă cu 15 ani, a constituit de-a lungul a 20 de ani, domeniul prioritar de cercetare al Institutului. Astăzi, patologia endoteliului vascular, reprezintă un element central în cardiologia modernă, în ateroscleroză, în hipertensiunea arterială, în boala cardiacă ischemică. În al treilea rând, înființarea Institutului de Biologie și Patologie Celulară a aruncat sămânța învățământului universitar de biologie celulară. În toamna anului 1979, târziu, când ocupam o funcție de conducere universitară la o discuție la Ministerul Educației s-a formulat un punct de vedere imediat, pentru introducerea biologiei celulare în învățământul universitar din țara noastră. Avizul a fost imediat și pozitiv, Și este o cinste pentru Rectorii din acea perioadă, cred că în toamna anului 1979, biologia celulară a intrat în planurile de învățământ ale studenților în medicină din țara noastră. Acest început timid și șovăitor a făcut ca studenții și viitorii medici să nu rămână în afara unor domenii de învățământ care de atunci s-au dezvoltat și sunt astăzi esențiale în pregătirea în medicina fundamentală și ulterior în medicina clinică..... Dar, toate acestea nu ar fi fost posibile fără dăruirea totală, înalta responsabilitate științifică, calităților de cercetător, educator și de conducător al Profesorului Nicolae Simionescu și a Profesorului Maya Simionescu. Destinul nedrept a făcut ca Prof. Nicolae Simionescu să nu fie prezent astăzi, dar spiritul său a rămas în Institut. Închei prin a spune că oricât de grele ar fi situațiile istorice, când există speranță și când există inteligență se poate realiza ceva. Și Institutul și D-voastră ați dovedit-o cu prisosință.

Cuvântul Acad. Eugen Simion la a 20-a Aniversare a IBPC-NS - 1999

Academician Eugen Simion
Președinte al Academiei Române

Domnilor Academicieni, Excelențe,
Domnilor Ambasadori, Domnilor Profesori,
Stimați colegi,

Fiind om de litere, discursul meu pare oarecum în afară de subiect, dar în calitatea pe care o am, aceea de președinte al Academiei, mă bucur ca împreună cu toată conducerea Academiei să fim de față aici, să asistăm la o sărbătoare care este a Dumneavoastră, a Institutului de Biologie și Patologie Celulară, dar este în același timp și a Academiei Române. O fac cu toată bucuria, cu toată plăcerea, cu tot respectul pentru munca Dumneavoastră și o fac în același timp, desigur și pentru faptul că Directorul acestui Institut este colega noastră Doamna Academician Maya Simionescu, care își împarte viața și inteligența între Academia Română, ca Vicepreședintă și acest Institut pe care l-a creat, în fond, împreună cu Nicolae Simionescu. Nu știu cum ați privit Dumneavoastră, fiind în specialitate, eu repet am o anumită percepție care vine din profesiunea mea și din educația sensibilității mele, dar prezentarea făcută aici a arătat cel puțin un lucru, că chiar în vremuri grele, într-o istorie imposibilă, cine a vrut să facă și cine a putut să facă sau a știut să facă ceva, a făcut ceva pentru știință. Este după părerea mea un fapt evident și îmi întărește ideea că totuși știința, în genere cultura, nu a șomat, nu a fost o Siberie a spiritului cum spun mulți dintre colegii noștri, mai ales cei care s-au stabilit în străinătate și că merită toată stima, tot respectul nostru, toată admirația noastră cei care repet, într-o istorie care părea și era opacă față de cultură, totuși au făcut lucruri splendide. Și într-adevăr, aici vreau să o confirm pe D-na Academician Maya Simionescu, că dacă există astăzi o școală de biologie celulară românească, dascălii ei și elevii ei și viitorii dascăli se găsesc în primul rând aici.

Doamnelor și domnilor, discursul meu va fi foarte scurt, totuși profit de această ocazie să vă spun că Academia Română are asemenea Institute. Are multe Institute, are 66 de Institute, are cam 4000 de oameni de cercetare și personal de cercetare. Cunoașteți bine dificultățile prin care treceți. Le trăiți, le trăim, le traversăm cu toții. E forte greu să faci cercetare într-o economie slabă și într-o lume care se schimbă foarte repede. Abia ajungi s-o prinzi din urmă și vezi că în alte locuri cercetarea în disciplina ta a luat-o cu mult înainte.În momentul de față asistăm la o regrupare, aproape dramatică, a forțelor de cercetare în câteva țări. Este vestita triadă America, Japonia și Europa Occidentală și în acest proces țările mai mici cu resurse mai mici sunt în pierdere de viteză. Mai mult își pierd și cercetătorii pentru că nu e o noutate pentru Dumneavoastră că țările bogate, care fac și cercetare fundamentală și cercetare amplă, cumpără, uneori foarte ieftin, inteligența din alte părți. Am participat de curând, împreună cu mulți dintre Dumneavoastră, aici de față, la două evenimente importante pe această temă. Este vorba de Conferința Mondială asupra științei, care a avut loc la sfârșitul lunii iunie, la Budapesta și unde au participat peste 2000 de oameni de știință și 150 de delegații naționale. Aceasta a fost tema care a revenit în discuție. Inteligențele merg acolo unde există posibilitate de cercetare și mai ales inteligențele din Estul Europei, din țările în curs de dezvoltare. Sigur că nu există nici o motivație ca noi, vorbesc acuma de Academia Română să împiedicăm circulația oamenilor, pentru că am împiedica circulația ideilor. Acest lucru s-a făcut, cum bine știți, timp de 50 de ani și n-a ieșit bine. Au ieșit atâtea drame, au ieșit atâtea proiecte care n-au mai fost duse la capăt. Problema care se pune astăzi, este după părerea mea - și a fost și tema de discuție la Budapesta și la o reuniune recentă, la mijlocul lunii august, organizată de noi la

Sinaia și unde au venit oameni foarte importanți și unde a revenit această temă -cum se poate stabili un echilibru corect, just, între țările care au mari posibilități și care acumulează toate forțele de cercetare și țările mai mici, care trec prin dificultăți și care vor să-și facă nu o știință națională, căci Dumneavostră știți mai bine, a spus-o Pasteur, dacă nu mă-nșel, că știința nu este niciodată națională, ea este pentru toată lumea, dar baze de cercetare într-o anumită țară. Din acest punct de vedere, deși toate previziunile sunt pesimiste, iată, într-un fel, expunerea făcută de Directorul Institutului de Biologie și Patologie Celulară "N. Simionescu", m-a făcut puțin mai optimist, văzând că, totuși este posibil, se poate face, poate fi un centru de excelență și luat în serios, și luat în serios, folosesc înadins o repetiție, cu seriozitate, pentru că noi românii, mă iertați, mă refer mai ales la cei din domeniul meu, noi avem o capacitate de a imagina relații internaționale și reputații internaționale. Orice fleac care apare într-o biografie sau într-un dicționar..., "omul anului" ș.a.m.d.

Astea sunt niște lucruri pe care cei care știu, râd de ele, dar... Avem o capacitate de a mistifica, suntem foarte iuți la minte din acest punct de vedere. Dar, iată, aici această recunoaștere internațională și această relație internațională este reală și cred că putem spune că Institutul Dumneavoastră este un punct de reper, pentru felul în care, în momentul de față cel puțin, trebuie să acționăm. Adică să fim inteligenți, să știm să depistăm sursele, să intrăm în aceste mari proiecte internaționale. Lucrul cel mai grav la ora actuală este că nu știm să ajungem la sursă. Este ca și cum prin această clădire, pe undeva, circulă banii prin niște tuburi și se întorc de unde au venit pentru că nu știm să ajungem la ei. Nu știm să facem formulările. Pierdem mai mult de jumătate din toate posibilitățile, pentru că o dată nu le facem la timp hârtiile și în al doilea rând pentru că nu știm să le completăm formularele, să umplem ca lumea, încât felicit pe membrii acestui Institut care au știut să intre în asemenea colaborări. Este o posibilitate, cea mai importantă la ora actuală.

Doamnelor și domnilor, nu vreau să prelungesc mai mult. Vreau să spun următorul lucru, că am meditat foarte mult la ce reprezentați Dumneavostră, oamenii de știință și de ce, nu numai eu, mulți care se ocupă, încearcă să gândească un pic lumea și felul în care ea evoluează, gândesc că modelul uman astăzi, sau ceea ce filozofii mai vechi numeau "forma mentis" al unei societăți, al unei epoci, al unei lumi, este astăzi omul de știință. Am discutat despre acest lucru la Sinaia, a fost tema comunicării mele, mă scuz pentru cei care au fost de față, dar vreau să reiau această idee spunând că toate marile epoci de creație au avut o "forma mentis", au avut un tip de creație. În antichitate, era înțeleptul. În evul mediu era sfântul și cavalerul, războinicul. Renașterea a adus creatorul, a pus în prim-plan creatorul și descoperitorul, cel care a descoperit lumea, a demostrat că Europa nu este singură ș.a.m.d. Romantismul a adus ideea geniului. "Forma mentis" este geniul, omul care suferă de universalitate, de incompletitudine, spunea un filozof german. Într-o epocă a noastră, la sfârșitul acestui secol și se pare în pragul unei alte revoluții, care va fi revoluția informațională sau revoluția mediului, a industriei care va fi dependentă din ce în ce mai mult de mediu, "forma mentis" este omul de știință. Dar este în același timp un om de cultură. Iarăși este o idee la care țin foarte mult, că nu ne mai putem imagina cultura astăzi, fără omul de știință. Aceste mecanisme ale biologiei la care, evident, eu mă uit cu ochii unui om de litere și încerc să văd care este misterul acestor lucruri, vă dați seama că un filozof nu mai poate face abstracție de aceste descoperiri, și în atâtea alte domenii, în domeniul fizicii... Filozoful va fi nevoit și nu numai el, cred că toți vom fi nevoiți să stăm foarte aproape de domeniul științei și să folosim

descoperirile ei. Așa încât, eu cred că Dumneavostră aveți o poziție privilegiată în această revoluție care se anunță, revoluția eco-industrială. Veți fi o figură privilegiată și în același timp plină de responsabilități. Aveți mari responsabilități față de societate, evident și cu aceasta închei, revenind la o problemă dureroasă care a fost ridicat aici, dar și societatea trebuie să aibe mari responsabilități față de Dumneavostră. Și trebuie să spun că societatea românească nu prea și le asumă.

Doamnă Academician Maya Simionescu, în această splendidă prezentare, vorbea despre faptul că Institutului Dumneavostră i s-a acordat dreptul de a conduce doctorat, masterat. Trebuie să vă spun ca să vă dezamăgesc că vi s-a luat acest drept. De curând, Parlamentul României, la sugestia Ministerului Învățământului, a luat dreptul Academiei de a mai conduce doctorate. De ce? Pare o absurditate. Un orgoliu de oameni care nu gândesc la binele societății. E limpede că nu se poate face cercetare de profunzime, decât într-un cadru ca acesta. Eu sunt profesor de trezeci și ceva de ani și știu ce înseamnă cercetare, cel puțin în domeniul meu. Înseamnă o căutare de negăsire. Inteligența unei societăți este să folosească mijloacele bune, câte sunt, puține, pentru a duce mai departe știința. Știm foarte bine cu ce salarii sunteți plătiți. Știm foarte bine că această hemoragie de creier s-a accentuat în ultimul timp. Academia Română încearcă să facă imposibilul, nu reușește întotdeauna, mai reușește să mai acopere câte un petec ici și colo, să mai pună... în fine, încercăm și noi ce putem, dar fără` un sprijin masiv din partea statului, pentru că cercetarea trebuie subvenționată și în același timp fără o inteligență productivă, creatoare, a directorilor și a celor care conduc Institutele evident că nu o vom scoate la capăt.

Închei încă o dată spunând că Academia Română este onorată, este bucuroasă că are Institute performante cum este acesta și vreau să vă spun că nu este singurul, sunt Institutele cu tradiție în Academia Română, Institute în domeniul umanistic, în domeniul filologiei, dar și în alte domenii, cum este Institutul de Matematică ș.a.m.d. și pe cât va fi omenește posibil vom căuta să sprijinim asemenea centre de excelență. Aș încheia cu o mică reflecție pe care o făceam ascultând expunerea dinainte. Mă gândeam în fond, care e deosebirea între științele noastre, științele umane, "umanioarele" și științele tari, sau științele exacte ale Dumneavoastră. Și mi-a venit în minte o remarcă a unui mare filozof, pe care eu, dintre francezi îl iubesc cel mai mult, care spunea că nu se apucă să caute cine n-ar fi găsit. Aceasta cred că ni se potrivește mai ales nouă, celor care vrem să facem ceva în domeniile științelor umane. Pentru că noi de fapt, nu găsim niciodată adevărul. Pentru noi este verosimilul, sunt științe ale verosimilității, dacă vreți. Noi dacă am găsi adevărul am fi terminați, ca să zicem așa. Deci, am închide disciplina. Pentru că în clipa în care eu aș spune adevărul definitiv, recunoscut despre Eminescu, evident că istoria literară, critica literară n-ar mai exista, pentru că s-a spus deja, ar fi un drum închis. Dumneavoastră în schimb, trebuie să ajungeți la adevăr. Sunteți chiar științele adevărului.Și mai apare o deosebire care este în favoarea noastră, că în timp ce în căutările noastre, noi profităm de ezitările nostre, de incertitudinile noastre, pentru a crea o operă. Pentru că în fond o operă trebuie să dea un punct de vedere și acel punct de vedere trebuie să fie în mod strălucit dovedit. Trăim din această ambiguitate, folosim eșecurile noastre și o carte splendidă, o carte a lui George Călinescu despre Eminescu, dar evident că nu spune adevărul integral despre Eminescu și totul este contestabil, dar ea în sine este excepțională. Dumneavoastră însă, trebuie să ajungeți la adevăr. Și eșecurile Dumneavoastră se pierd, nu le puteți valorifica decât prin faptul că ați epuizat un drum greșit și trebuie să căutați altul. În acesta stă cred eu, frumusețea culturii, cu cele două brațe ale ei. Una care caută să ajungă la adevăr și ajunge în cele din urmă, una care încearcă să valorifice eșecurile.

Vă mutumesc și Felicitări!

Cuvântul Prof. Marilyn Farquhar la a 20-a Aniversare a IBPC-NS - 1999

Marilyn Farquhar
Profesor, Departamentul de Medicină Celulară și Moleculară,
University of California, San Diego, SUA

Dragă Maya,

Felicitări cu ocazia aniversării a douăzeci de ani de la înființarea Institutului!

Este greu de crezut că au trecut douăzeci de ani de când ne-am întâlnit la București, la Simpozionul inaugural al Institutului. Înființarea institutului a fost ea însăși un eveniment remarcabil, ținând cont de circumstanțele politice dificile din acel timp. Pe scurt, a fost un miracol. Dar, un miracol mai mare a fost faptul că Institutul a supraviețuit și a prosperat în timp, având nenumărate contribuții în înțelegerea patologiei celulei, în special în domeniul mecanismelor bolilor cardiovasculare.

Mai mult, când Institutul a fost inaugurat, a fost gândit, de tine și de Nicolae Simionescu, ca un centru pentru competiție științifică, în care tinerii cercetători români să se specializeze la cel mai înalt nivel în domeniul Biologiei și Patologiei Celulare. Un alt record, de care, în mod justificat puteți fi mândri, și o altă vie contribuție a Institutului la viața științifică națională și internațională, sunt numeroșii tineri cercetători remarcabili, pe care i-ați format și pe care îi mai formați încă.

Eu sper că următorii douăzeci de ani vă vor aduce chiar mai multe succese decât primii douăzeci. La mulți ani!

Alumni IBPC–NS la a 20-a Aniversare a IBPC-NS - 1999

1989

Dr. Anca Dobrian

Eastern Virginia Medical School, USA
Alumni IBPC

Ce am primit fiecare dintre noi și purtăm cu noi în permanență, indiferent în ce colț al lumii ne-au împins destinele personale? Respectul pentru muncă și adevărul științific, grija pentru întreg și, în egală măsură, pentru amănunt și context. Am învățat ce înseamnă lucrul meticulos și corect, cum să ne comunicăm ideile și rezultatele, cât de importantă și plăcută este munca în echipă. Nu am avut senzația că venim la lucru, lucrul era parte din întregul vieții noastre și Institutul era a doua familie.

Am plâns și am râs împreună, ca orice ființă omenească copleșită de prea multe poveri sau fericită pentru împliniri. Am învățat că schimbarea paradigmelor în știință cere inteligența de a observa și explica lucruri aparent improbabile și perseverența de a le impune lumii științifice, cu spirit critic și luciditate. Am învățat că a-ți recunoaște greșelile și imperfecțiunile de moment nu este o rușine ci o sursă de învățătură pentru mai târziu. Și nu în ultimul rând am învățat că știința înseamnă renunțare la multe, multă muncă și răbdare. Sunt, cred, lucrurile esențiale, fără de care oricât de învățat ai fi, nu poți face știință de calitate pe termen lung.

Șansa noastră a fost ca toate aceste lucruri să ne vină sub formă de exemple, de la oamenii cu care am lucrat. Ei ne-au dat mereu, de-a lungul anilor, putere și speranță, ne-au învățat cu dragoste și profesionalism și ne-au corectat greșelile, folosind mănuși de catifea. De aceea, tot ce am scris mai sus nu sunt simple învățături impersonale, ci poartă învelișul unor amintiri dragi. De aceea sunt atât de persistente și se confundă mereu cu prezentul.

La toate acestea se adaugă o imagine care îmi răsare în minte, nu de puține ori, în diminețile când mă trezesc departe de casă: o clădire alb-roșie, cu trei etaje, însoțită de pomi și flori, în care se transmit aceleași daruri și se continuă truda începută cu 20 de ani în urmă cu mintea, inimile și mâinile dragilor noștri Profesori, Maya și Nicolae Simionescu.

Dr. Cristina Iftode

New York University, NY, USA
Alumni IBPC

Dragă D-nă Maya ,

Anii petrecuți în IBPC, de la marile emoții ale interviului de angajare cu dumneavoastră (unic în felul lui pentru lumea românească a acelor ani) din noiembrie 1987, până la despărțirea din octombrie 1991, au reprezentat o perioadă extrem de fericită pentru mine. Acolo am făcut cunoștință cu adevărat cu biologia celulară

și moleculară, trecând dincolo de litera cărții la experimente pe care nu mi le-aș fi închipuit posibile. Nu voi uita schimburile de replici științifice, și nu numai, din cadrul seminariilor lunilor februarie-martie sau de la sesiunile SNBC, senzația de mare familie pe care dumneavoastră și d-nul Profesor ați creat-o după ani de zile de colaborare apropiată cu fiecare cercetător.

Oricât de prețios ar suna, sunt sincer mândră că mi-ați oferit ocazia să fac parte din marea familie a IBPC-iștilor. Experiența profesională și umană dobândită în institut mi-a folosit enorm în anii de doctorat de la NYU și a atenuat incredibil de mult șocul adaptării la lumea științifică americană.

În institut am legat prietenii extrem de strânse, cum se spune că numai în anii școlii se întâmplă. Dar ce altceva decât o școală a fost IBPC pentru noi toți? Oriunde m-aș afla, în viitor ca și până acum, îmi voi aminti cu nespusă plăcere și nostalgie de anii petrecuți în clădirea de pe strada Hașdeu nr.8. Și tare aș fi vrut să ne reîntâlnim cu toții, cei noi și cei vechi, la acest moment aniversar. Dar cum nu a fost să fie așa, nu-mi rămâne decât să urez ”electronic” institutului, dumneavoastră și iubiților mei colegi,

Mulți ani și multe succese!

Dr. Silviu Leonard Faitar

State University of New York,
Buffalo,USA Alumni IBPC

Dragă D-nă Maya ,

Este greu de definit ce a însemnat apartenența la IBPC pentru mine, iar o încercare de generalizare mă tem că ar suna exagerat de simplistă. Totuși, sunt convins că nu aș fi ajuns să practic această profesiune dinamică, plină de satisfacții și neprevăzut, fără anii de ucenicie din Institut.Îmi este încă vie în memorie ziua când student fiind, am călcat pentru prima dată acolo. Am fost aproape paralizat de emoție la vederea computerelor și aparaturii științifice. Mai văzusem așa ceva doar în serialele de popularizare a științei de la televizor. Ca student și mai apoi tânăr cercetător am beneficiat de bază materială și informațională

de excepție, dar cel mai de preț au fost modelele umane întâlnite. Bineînțeles, mă refer în primul rând la Domnul Profesor, a cărui erudiție și claritate în gândire nu am mai întâlnit-o nici măcar de această parte a Atlanticului. Încă îmi amintesc fiecare laborator sau birou, împreună cu chipurile zâmbitoare ale celor care lucrau acolo, ba chiar și proiectele la care lucrau atunci când am plecat. Simt și acum nodul din gât pe care îl aveam înaintea fiecărui seminar, dar și bucuria cu care plecam la fiecare sesiune SNBC. Dorința Profesorului de a forma o adevărată familie în Institut se materializa adeseori în momente de neuitat, cum ar fi ultimul Crăciun petrecut împreună, când a împărțit daruri tuturor și a cântat colinde împreună cu noi.

In amintirea tuturor acestor clipe de neuitat petrecute în umbra Podului Hașdeu, de aici, din vecinătatea Niagarei, aș vrea să-i felicit pe toți actualii și foștii IBPC-iști pentru rezultatele obținute în cele două decenii de progres și afirmare.

2000

IBPC "Nicolae Simionescu" a fost selectat prin competiţie

Centrul de Excelență al Comunității Europene

Titlul proiectului:
Funcționarea și disfuncția vaselor de sânge: transcitoza în condiții normale / stări patologice, modificări ale aterosclerozei și diabetului; al lor controlul terapeutic
Coordonator: dr. Maya Simionescu, ICBP-NS

Obiectivele principale ale proiectului:

Creșterea competenței de cercetare a Centrului în domeniul științelor biomedicale.

Intensificarea schimburilor dintre cercetătorii noştri şi oamenii de ştiinţă din UE şi mărirea vizibilitatea Centrului nostru.

Sporirea participării la PC 5/6 și viitoarele programe UE.

CURSURI POSTUNIVERSITARE DE PERFECTIONARE (2000-2008)

”Merită să trăiești în România pentru această școală!”

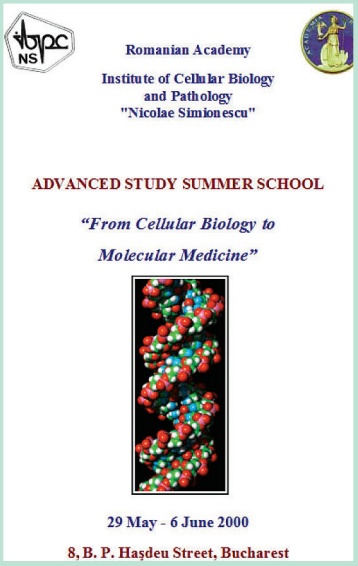
Dr. Anca V. Sima,
Director executiv al Cursului

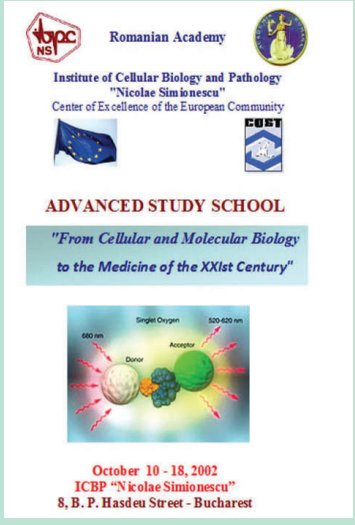
Institutul de Biologie și Patologie Celulară “Nicolae Simionescu” al Academiei Române a organizat în anii 2000 - 2008 nouă ediții a Cursului postuniversitar de perfecționare intitulat “De la Biologia Celulară și Moleculară la Medicina Secolului XXI”, curs desfășurat pe perioada a 2 săptămâni.

Fondatorii Institutului nostru mărturiseau că “de la conceperea lui, Institutul nostru a fost gândit ca o instituție de cultură în care se lucrează știință. Această concepție are la bază două idei general acceptate: 1) știința este parte a culturii și 2) cultura înseamnă 3 lucruri: creație, asimilare și transmitere de valori.” În acest spirit, din inițiativa d-nei Academician Maya Simionescu, Vicepreședinte al Academiei Române, în anul 2000 am organizat pentru prima dată un curs postuniversitar destinat tinerilor cercetători, medici și cadre universitare din întreaga țară, cu scopul informării lor cu cele mai noi cunoștințe din domeniul biomedical, domeniu ce are în prezent o dezvoltare explozivă, rezultatele excepționale ale ultimului an, care cuprind descifrarea genomului uman, putând contribui la o revoluție în medicină. Interesul deosebit arătat de participanții la prima ediție și numărul mare de cereri primite pentru organizarea uneia noi, au determinat susținerea celei de-a doua ediții anul acesta.

Ca să fie accesibil oricărui tânăr specialist, institutul nu a perceput taxe pentru participarea la curs, ci l-a organizat prin entuziasmul cercetătorilor din IBPC și generozitatea profesorilor care au răspuns invitației de a susține prelegeri, primind în dar din partea organizatorilor doar un simbolic copăcel al vieții.

Obiectivele urmărite de noi, organizatorii, au fost perfecționarea tinerilor cercetători și specialiști în domeniul biomedical în spiritul celor mai noi cunoștințe de biologie celulară, moleculară și genetică, aplicate la patologia majoră care afectează starea de sănătate a populației țării noastre, precum și demonstrarea unor tehnici de ultimă oră privind culturile de celule, microscopia electronică, analiza computerizată de imagine, citometria în flux, cromatografie la presiune înaltă, tehnica de "patch-clamp", amplificarea și revers transcrierea genică.





Cursurile au fost susținute de profesori universitari și cercetători din țară (București, Cluj-Napoca) și străinătate (Belgia, Franța, Grecia, Yugoslavia). Am fost deosebit de onorați și emoționați să avem printre conferențiari pe Profesorul Christian de Duve, laureat al Premiului Nobel pentru medicină. Acestaa descris etapele descoperirii lisosomilor (pentru care i s-a acordat Premiul Nobel), și a încurajat tinerii să aleagă calea cercetării științifice, cale grea, dar plină de "aventură" și bucurii.

Au prezentat conferințe: Prof. Eduard Apetrei și Prof. Carmen Ginghină, Institutul de Boli Cardiovasculare "Prof. C. C. Iliescu", București; Dr. Monica Căpraru, Spitalul Militar "D. Gerota", București; Prof. Dan Cheța, Institutul de Nutriție și Boli Metabolice "N. Paulescu", București; Prof. Mihai Coculescu, Facultatea de Medicină, UMF "Carol Davila", București; Prof. Andrei G. Dan, Spitalul Colentina, București; Prof. Maria Luiza Flonta, Prof. Dana Iordăchescu, Prof. Aurel Popescu, Universitatea din București; Prof. Nicolae Ghilezan, Institutul Oncologic Cluj-Napoca; Prof. Vangelis Manolopoulos, Democritus University of Trace, Alexandropolis, Grecia; Prof. Jean Montreuil, Université des Sciences et Technologies, Lille, Franța; Acad. Laurențiu M. Popescu, Universitatea de Medicină și Farmacie "Carol Davila", București; Acad. Octavian Popescu, Universitatea "Babeș-Bolyai", Cluj-Napoca; Acad. Victor Voicu, Centrul de Cercetări Științifice Medico-Militare, București; Acad. Ioanel Haiduc, președintele Academiei Romane.

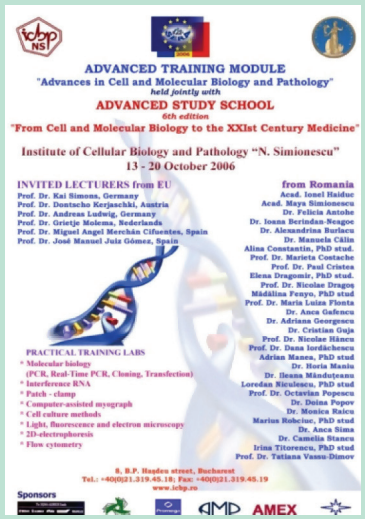
Demonstrațiile practice au fost susținute în laboratoarele Institutului, sub îndrumarea tinerilor cercetători de la noi și cu participarea activă a fiecărui cursant.

Din Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" au susținut conferințe sau demonstrații practice: Prof. Maya Simionescu, Dr. Dorin Alexandru, Dr. Felicia Antohe, Dr. Elena Constantinescu, Dr. Victor V. Jinga, Dr. Ileana Mânduțeanu, Dr. Loredan Niculescu, Dr. Doina Popov, Dr. Anca Sima, Dr. Daniela Tîrziu, Dr. Alexandrina Burlacu, Dr. Gabriela Costache, Dr. Anca Gafencu, Dr. Adriana Georgescu, Dr. Camelia Sorina Stancu.

Au participat cursanți din București, Timișoara, Constanța și Iași, cadre didactice, medici rezidenți și specialiști, tineri cercetători. La sfârșitul cursurilor aceștia au primit diplome de absolvire, creditate de Colegiul Medicilor sau Biochimiștilor din România. La testul final, majoritatea tinerilor participanți au apreciat cursul ca excelent. Părerea generală a exprimat-o, cel mai bine cred, domnul Dr. Petre Cristea, de la Centrul de Cercetări științifice Medico- Militare București:

"Cred despre acest gen de școală că este unică pentru România, prin ineditul, valoarea, excelența prezentărilor, a lecțiilor, prin ținuta intelectuală și organizarea ireproșabilă. Așa ceva poate s-ar mai fi făcut pe vremea lui D. Gusti sau N. Iorga!

IBPC-NS se află situat într-un perimetru destinat Bucureștiului de excepție: un perimetru care geografic începe cu ctitoria Generalului Dr. Carol Davila, continuând cu ctitoria Prof. Dr. C. Cantacuzino, apoi cu cea a Prof. Dr. V. Babeș și se încheie



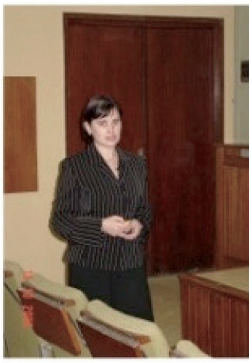
miraculos cu ctitoria de la care am început; văzându-i pe Prof. Dr. Maya Simionescu și Nicolae Simionescu asemenea vechilor voievozi, ținând în mâinile lor această bijuterie de seamă a sufletului, muncii lor de cercetători, de dascăli, alături de cercetătorii ei formidabili.

Am simțit în Institutul dumneavoastră o stare de grație, am regăsit și m-am bucurat că există și la noi știință la cotele ei cele mai fierbinți și înalte. Merită să trăiești în România pentru această școală! Cursurile și lucrările practice efectuate în această extraordinară familie de cercetători, alături de cele mai prestigioase nume ale medicinei, biologiei, biochimiei, geneticii m-au făcut să trăiesc o stare de grație, mi-au întărit sensul existenței mele științifice. Un loc unic, remarcabil, o școală în care m-am bucurat și am fost fericit în tot timpul. Nu pot decât să mulțumesc frumos, să-mi doresc să vin negreșit și la anul. Știu că în săptămânile care vor urma, aceste ore petrecute aici mă vor urmări, îmi vor aduce idei, vor fi un sprijin teoretic și practic substanțial și un îndemn de a vedea în cercetare un tot fenomenologic celular.

Și încă ceva: nu am văzut nicăieri, în București, în România, în mediul medical, grija pioasă pe care o aveți pentru istoria Institutului, pentru cei care au fost ai Institutului și au fost viața acestuia. Nu cred să fi văzut altundeva și să fi simțit prezența unei stări pozitive aparte, pe care chipul Profesorului Nicolae Simionescu parcă o veghează cu frumusețea ființei și adâncimea privirilor sale.

Este o lecție extraordinară tot acest Institut.

Vă mulțumesc mult, mult de tot!"



Impresiile cursanților

Călin V. Andrițoiu
Medic doctorand la
Catedra de Fiziopatologie,
UMF "Gr. T. Popa", Iași

Vă felicit pentru buna organizare a cursului. Am de asemenea o experiență de organizator de cursuri în cadrul ANATECOR-ului (Asociația Națională de Terapii Complementare din România, cu sediul în Arad). Am învățat multe de la Dvs .Vă mulțumesc și vă doresc să vă dezvoltați în continuare.Singura sugestie pe care o pot face este: se simte nevoia unui suport de curs. Din discuțiile cu colegii, mi-am dat seama că și ei și-ar fi dorit să primească lucrările, susținute pe suport electronic, eventual.

Cerasela Paraschiv
Medic specialist medicină internă,Asistent universitar, Catedra Genetică, Medicină Generală, UMF "Carol Davila", București

Stimați organizatori,
Apreciez acest curs maraton ca pe o inițiativă extraordinar de utilă în scopul de a împărtăși din experiența acumulată de cercetătorii institutului atât în activitatea de zi cu zi cât și din activitatea de prezentare în revistele de specialitate internaționale sau la diversele burse în universitățile de prestigiu ale lumii.Pentru noi, cercetătorii mai tineri, sau clinicieni, este o buna ocazie de a deschide încă o fereastră prin care să fim în conexiune directă cu cele mai recente descoperiri în biologia moleculară.

Am fost impresionată de munca titanică depusă de cei doi fondatori ai Institutului, Domnul Profesor Nicolae Simionescu și Doamna Academician Maya Simionescu și, mai ales de reușita lor în a-și împlini un crez. Iată, Institutul trăiește și este un nume în elita mondială a cercetării biomoleculare.

Auspiciile favorabile sub care s-a desfașurat cursul au fost dublate de un înalt profesionalism, seriozitate, competență, ceea ce mă face să mulțumesc și pe această cale Directorului Executiv al cursului, Dnei Dr.Anca Sima, ghidul nostru neobosit în această săptamână.

Gabriela Teodosiu
Cercetător științific, Centrul de Microbiologie, Institutul de Biologie al Academiei Române, București

Aș dori să remarc organizarea excelentă a cursului, prezentările deosebit de interesante și profesionalismul deosebit al tuturor cercetătorilor din I.B.P.C."Nicolae Simionescu" implicați în realizarea cursului. De asemenea, am fost impresionată de atmosfera de înaltă ținută științifică și de relațiile excelente dintre tinerii cercetători și colegii cu experiență. Datele și informațiile deosebit de interesante primite pe parcursul cursului vor fi utile pentru aprofundarea cunoștințelor și lărgirea orizontului științific al cursanților.

Balotescu Mariana Carmen
Biolog, Inst. Cantacuzino

Am fost extraordinar de impresionată de modul în care ați reușit, prin subiectele abordate și prin alegerea conferențiarilor din diferite specialități, să răspundeți orientării multidisciplinare a științei secolului XXI. Acest curs a arătat, o dată în plus, că specializarea fără ansamblu nu duce nicăieri și a oferit informații foarte utile pentru

constituirea unui "background" ştiinţific care este indispensabil pentru evoluţia ulterioară a unui tânăr cercetător.
Am apreciat şi am simpatizat cu concepţia majorităţii conferenţiarilor audiaţi că "ştiinţa fără conştiinţă" nu se mai poate. Bineînţeles, pentru un tânăr cercetător, acest curs a reprezentat şi un proces de "anamnesis", o lecţie de educaţie, despre respectul care trebuie arătat predecesorilor noştri căci, dacă noi vom putea privi mai departe, este datorită faptului că stăm pe umerii unor uriaşi. Avem datoria aproape "sacră" să-i cunoaştem, tot astfel cum un popor trebuie să-şi cunoască istoria.
Climatul ştiinţific din Institutul dvs. este de invidiat şi ar merita "copiat" (cu voia dvs.) de către alte institute de cercetare din România care suferă puternic de pe urma "eroziunii umanităţii".

Ruxandra Gătină
CP, Inst. "V. Babeş"

Doresc să faceţi un site pe Internet în care, în urma fiecărui curs, să găsim introduse prezentările, pentru că oricât m-am străduit să iau notiţe, proiecţiile se succedau prea repede şi nu apucam să fac decât o parte din scheme (care astfel au rămas incomplete).
Dacă nu se poate varianta propusă mai sus, sugerez ca fiecare conferenţiar să aibă cursul într-o variantă scoasă la imprimantă, care să poată fi trasă la Xerox de către doritori. De asemenea, ar fi bună şi o pagină cu bibliografie selectivă în domeniu (lucrări, cărţi, articole de referinţă) pe care cursantul să o poată trage la Xerox.
Ţin să mulţumesc din suflet tuturor profesorilor care ne-au lărgit orizontul în cadrul acestui curs, căci deşi subiectele au abordat un spectru foarte larg de preocupări şi modalităţi practice de realizare, toate prezentările au avut fluiditate, rigurozitate, o bună informare şi mult farmec personal, izvorât din dorinţa evidentă de a face totul cât mai bine şi cât mai frumos.

Tarniţă Georgeta
Biochimist, Inst. "V. Babeş"

Pentru mine acest curs a însemnat foarte mult, deoarece am avut şansa de a fi selecţionată dintr-un număr foarte mare de cursanţi; am putut astfel afla informaţiile "de ultimă oră" din domeniul cercetării şi mi-am dat seama cât de importantă este cercetarea şi faptul că avem oameni foarte valoroşi care se preocupă, se dedică în totalitate acestei meserii. Eu sunt încă la început de drum (lucrez de foarte puţin timp la Inst. V. Babeş şi este primul meu loc de muncă), dar acest curs m-a convins că munca de cercetare este foarte laborioasă, dar şi rezultatele obţinute pot fi pe măsura efortului depus.
Mulţumim organizatorilor acestui curs, să puteţi continua mulţi ani pe acest drum, să aveţi numai bucurii şi satisfacţii şi, poate, veţi da un imbold şi altor institute să vă urmeze exemplul (desigur, în măsura posibilităţilor).

Tudor Petreuș
Medic specialist, UMF "Gr. T. Popa", Iași

1. Să nu se întrerupă acestă frumoasă tradiție.
2. Tematicile să fie conjuncte - anul acesta au fost puțin răsfirate sau axate pe tematici foarte înguste.
3. În general ar fi nevoie și de un tempo de aprofundare a noțiunilor achiziționate prin timp petrecut în bibliotecă.
4. În afară de admiratori ai cursului ați putea coopta posibili colaboratori (dacă duceți lipsă) sau generatori de idei - care nu sunt oricum inutili.
5. OSPITALITATE, RIGUROZITATE, CONTINUITATE - această mini-revoluție științifică (Je la salue)
6. Felicitări pentru personalitățile invitate.
7. Creșterea interactivității - ședințe post-cursuri - BRAIN STORMING
8. Pagină de web - înainte și după cursuri, e-mail

Ar face cursul să continue și ecourile să se perpetueze.
Vă mulțumesc,

Elisabeta Bădilă,
Medic specialist, Spitalul de Urgență Floreasca

Am primit mai mult decât m-am așteptat.

2004

SIMPOZIONUL ANIVERSAR 25 DE ANI DE IBPC-NS

"Cell and molecular biology a key to defeat global risk diseases: atherosclerosis, diabetes and immune disorders"

THE ROMANIAN ACADEMY

THE INSTITUTE OF
CELLULAR BIOLOGY AND PATHOLOGY
"NICOLAE SIMIONESCU"
Center of Excellence of the European Community

at

25 years
Anniversary Workshop

Cell and molecular biology a key to defeat global risk diseases: atherosclerosis, diabetes and immune disorders

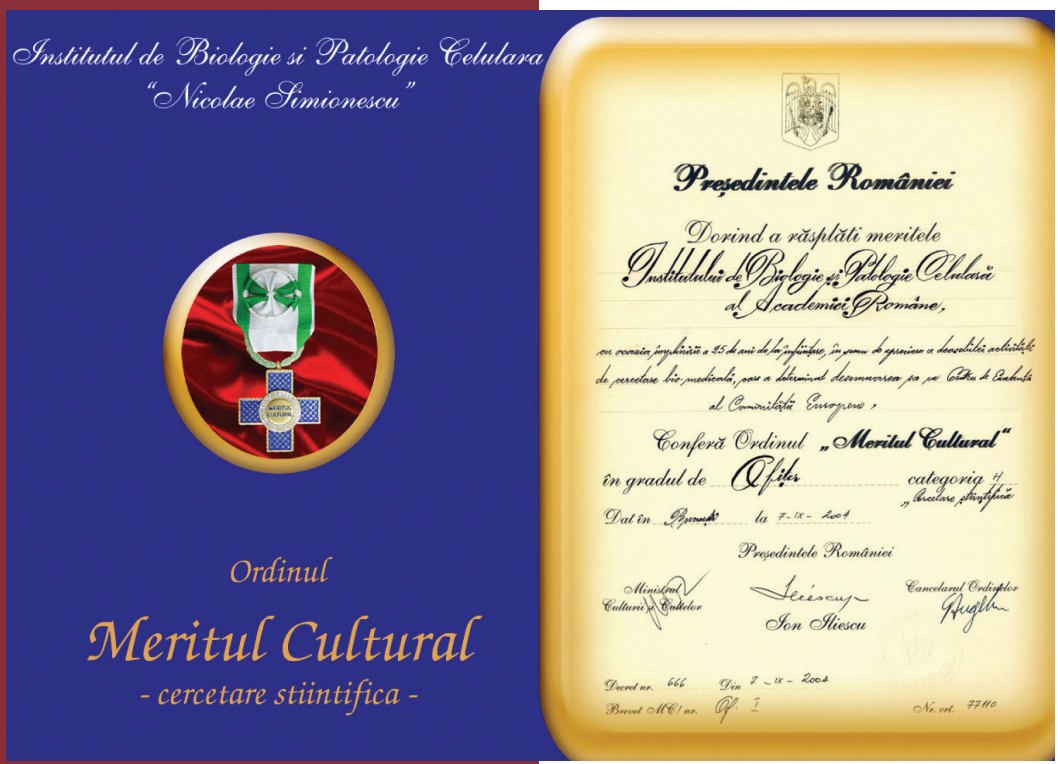
Main Sponsor

BANCA
COMERCIALA
ROMANA

Felicia Antohe
John Bergeron
Constantin Bona
Alexandrina Burlacu
Cosmin Catana
John Catravas
Gabriela Costache
Peter Csonnely
Alice Dautry-Varsat
Anca Dobrian
Maria Dorobantu
Elena Dragomir
Jurgen Eckel
Anton Fixmann
Jean Charles Fruchar
Jamila Fruchart-Naji
Anca Gafencu
Adriana Georgescu
Nicolae Ghinea
Francesco Giorgino
Constantina Haltiuni
Nicolae Hâncu
Marton Hofker
Cristina Ifteni
C. Ionescu-Tirgovist
Tatsuhiko Kodam
Dimitris Kardassis
Petri Kovanen
Kyriacos Kyprou
Adrian Manea
Jean Montreuil
Florin Niculescu
Chris Packard
Octavian Popescu
Doina Popov
Aurelian Radu
Luminita Radulescu
Horia Rus
Samuel Silverstein
Anca Sima
Maya Simionescu
Camelia Stancu
Manuela Voina
Vassilis Zannis

NICOLAE SIMIONESCU
SOCIETATEA NATIONALA DE BIOLOGIE CELULARA

IBPC-NS LA ANIVERSAREA A 25 DE ANI



Conferirea de către Președinția României a Ordinului "Meritul Cultural" în grad de Ofițer –

dorind a răsplăti meritele IBPC și în semn de apreciere a deosebitei activități de cercetare biomedicală care a determinat desemnarea Institutului ca Centru de Excelență al Comunității Europene

Mesaj la a 25-a Aniversare a IBPC-NS - 2004

Professors Isabelle Joris-Majno and Guido Majno

The ICBP comes of age: memories from the first twenty-five years

Sorrow is mixed with happiness as we prepare to celebrate the Nicolae Simionescu Institute - in the absence of Nicolae. How ironical that he should have been taken away by the disease on which the Institute is focused. We feel extremely privileged for having shared with Nicolae and Maya a treasure of memories reaching back some 28 years, including what we might call the embryonic stage of the Institute.

It was 1975 when we met two brilliant cell biologists generally known as The Simionescus (sometimes also, inevitably, The SimoNIESCUs). They had been personally handpicked in Bucharest by Dr. George Palade; in his famed laboratory they acquired their passion for the endothelium. In those days, endothelium seemed to be everywhere (which of course it is); and everybody in the field soon learned that if you wanted to know the latest in endothelial experiments you needed to call either one of the two charming Românians. Dr. Palade introduced us to them and it was instant friendship (in fact, Nicolae became a witness at our wedding). In their work they had the same rigorous standards as Dr.Palade; they also shared his distinctive Românian accent, conveying the impression that to be at the cutting edge of endothelial biology you had to be able to pronounce properly such words as the RRRibosomes and TRRRanscytosis (and there was some truth to that, too).

The Simionescus made it clear that they were not defectors from România; quite to the contrary,

Profesorii Isabelle Joris-Majno și Guido Majno

ICBP are o vârstă: amintirile primilor 25 de ani

Tristețea se amestecă cu bucuria acum când ne pregătim să sărbătorim Institutul lui Nicolae Simionescu - în absența lui. Ce ironie a sorții a făcut ca el sa fie doborât tocmai de maladia care formează subiectul de cercetare al Institutului. Noi ne simțim exterm de privilegiați de a avea împreuna cu Nicolae și Maya o intregă comoară de amintiri, unele chiar de acum 28 de ani, din etapa pe care am putea-o numi stadiul embrionar al Institutului.

În 1975 am întâlnit doi biologi celulari eminenti, cunoscuți ca "Cei doi Simionescu" (și, uneori, inevitabil, "SimoNIESCUs"). Ei au fost aleși personal de Dr. George Palade în București; în laboratorul renumit al Dr. Palade, au devenit pasionați de studiul endoteliului. La acea vreme, endoteliul era peste tot (ceea ce așa și este); și fiecare cercetător în acest domeniu și-a dat seama că dacă vrei să știi noutățile asupra endoteliului trebuie să vii în contact fie cu unul fie cu ambii cercetători români. Ne-a facut cunostință cu ei Dr. Palade, iar prietenia noastră a fost instantanee (de fapt, Nicolae ne-a fost martor la nuntă). În cercetare, ei aveau aceleași standarde riguroase ca Dr.Palade; aveau același accent distinct "RRRomanian" lăsând impresia că pentru a fi la vârful biologiei endoteliului trebuie să ai o pronunție adecvata a unor cuvinte ca "RRRibosomes" și "TRRRanscytosis" (și aceasta era adevărat).

Cei doi Simionescu au arătat clar că ei nu erau dezertori din Romania, ci dimpotrivă, ei așteptau

they were waiting for their new Institute to be built - according to their carefully drafted plans. We were working in Worcester, at the University of Massachusetts Medical School. The distance from New Haven and Worcester was too long for just having dinner together; so we met half-way, wherever there seemed to be a reasonable "osteria". If there was enough time we spent a whole weekend in Hamden or in Worcester. Wherever we were, we discussed our experiments in detail; it never occurred to us that we were - quite literally - competitors.

Nicolae and Maya drew sketches of their future Institute on paper napkins of the restaurant. It sounded like a researcher's dream: here were biologists designing their scientific nest, and this nest would include biology and pathology. As far as we know, this key feature of the ICBP was unique at that time; those two joined letters - BP - represent a working plan as well as a philosophy of nature: pathology is not a science per se, but an extension of normal biology. Virchow, the founder of modern pathology, expressed this concept in 1858: "Pathology is physiology with obstacles" ("Physiologie mit Hindernissen"). It follows that one cannot fully understand the normal without the abnormal, and vice versa.

The grand opening of the ICBP came in 1979. Great news, but life, alas, became even more stressful for the Simionescus; according to a signed agreement, they were supposed to take leave for 3 months every year to the USA, for the purpose of further training. What if the

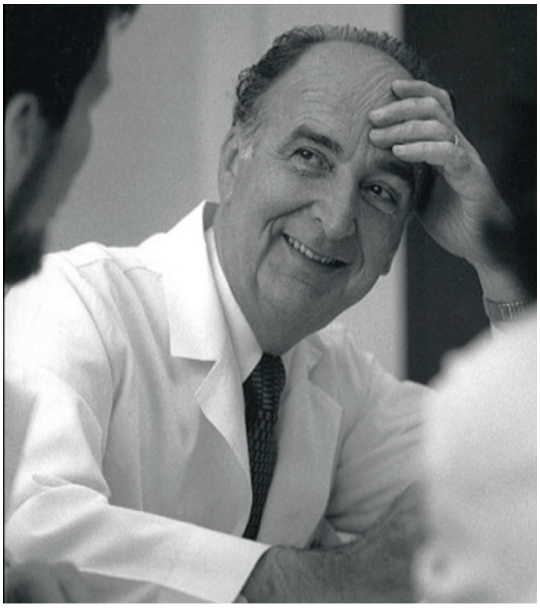
să se construiască noul lor Institut conform cu planurile pe care le trasaseră cu atenție și grijă. Noi lucram în Worcester, la Universitatea din Massachusetts, Facultatea de Medicină. Distanța dintre New Haven și Worcester era prea lungă pentru a lua masa împreună, de exemplu, așa că ne întâlneam la jumătatea drumului, oriunde ni se părea adecvat. Dacă aveam timp suficient, petreceam un sfârșit de săptamână la Hamden sau la Worcester. Oriunde ne întâlneam discutam în detaliu experimentele și nu am fost niciodată competitori.

Nicolae si Maya desenau planurile viitorului Institut pe șervețele de hârtie de la restaurant. Părea ca un vis de cercetător: biologi desenând cuibul lor științific, un cuib care include biologie și patologie. Dupa câte cunoaștem noi, această caracteristică a ICBP era unică la acel moment; cele doua litere reunite - BP – reprezintă un plan de lucru, dar și o filosofie a naturii: patologia nu este o știință per se, ci o extindere a biologiei normale. Virchow, fondatorul patologiei moderne exprima acest concept în 1858: "Patologia este fiziologie cu obstacole" ("Physiologie mit Hindernissen"). Rezultă că nu poți înțelege complet starea normală, fără cea anormală, și invers.

ICBP și-a început activitatea în 1979. O veste bună, dar viața a devenit din ce în ce mai stresantă pentru soții Simionescu; ei erau invitați în fiecare an pentru 3 luni în SUA în scopul unor cercetări și activități didactice avansate. Dar dacă Guvernul le refuza viza de ieșire? Ce s-ar fi întâmplat cu angajamentele de la Universitățile

Government denied the exit visa? What would they do at Yale, at Columbia, at Rockefeller,and elsewhere where Maya and Nicolae had teaching commitments? This particular catastrophe came close to materialize more than once, and the resulting stress was difficult to bear even for us.

Twice in later years we had the pleasure and honor of visiting the ICBP. The reception orchestrated by the Simionescus for their guests was so overwhelming that the human aspects of the encounter became as unforgettable as the scientific achievements. One of us (admittedly, GM) was quite taken by the beautiful names of the ladies: Doina, for example, sounds to an Italian ear like two musical notes, played on an ancient toaca.



And then, Nicolae and Maya managed to organize for the visitors - despite the difficult times and related dire shortages - meals of tasty Românian dishes, of the unforgettable kind. Another miraculous experience - not for the taste buds, this time, but for the organ of Corti - was the sound of a violinist, an elderly gentleman who played as he walked around the tables of a restaurant. While he walked he played his instrument very, very gently; he came close almost touching our ear - and it was pure sound, pure music, without any of the mechanical noises typical of the bow of a violin. It was quite extraordinary, and to an amateur violinist, utterly impossible.

When we visited the laboratories, we were stunned by the efforts of the research teams in the name of economy. At the last moment,

Yale, Columbia, Rockefeller sau din alte locuri unde Maya şi Nicolae erau invitaţi să predea? Aceasta catastrofă a fost cât-pe-ce să se întâmple de mai multe ori, iar stresul acesteia a fost greu de suportat chiar şi de noi.

În ultimii ani am avut de două ori plăcerea şi onoarea de a vizita ICBP. Primirea organizată de soţii Simionescu pentru musafiri era aşa de extraordinară încât aspectele umane ale revederii au rămas în memorie la fel de intense cu cele ale realizărilor ştiinţifice. Unul din noi (GM) a fost impresionat de numele frumoase ale doamnelor: Doina, de exemplu suna în urechea unui italian ca două note muzicale ale unui instrument străvechi (toaca). Cu toate lipsurile şi dificultăţile vremurilor, Nicolae şi Maya reuşeau să organizeze pentru vizitatori menu-uri românesti de neuitat. O altă experienţă de neuitat, de data aceasta pentru urechea muzicală, au fost sunetele unui violinist, un domn mai în vârsta, care ne-a încântat cu melodiile sale. În timp ce cânta la vioară, se apropia blând de urechea noastră şi eram martorii unui sunet pur, de muzică pură fără nici un zgomot mecanic interferent. A fost extraordinar, iar pentru un violonist amator este imposibil de realizat aşa ceva.

Când am vizitat laboratoarele am fost uluiţi de eforturile echipei de cercetare în numele "economiei". În ultimul moment guvernul decisese să plătească salariile, dar nu şi materialele de laborator. Nimic nu era de unică folosinţă; nici chiar soluţiile. Când minusculele preparatele ce urmau a fi examinate prin

the government had provided salaries but no supplies. Nothing was used once; not even the solutions. When tiny specimens were fixed in osmium fore electron microscopy, the osmium was extracted from the remaining tissues and used again.

Judging from the results, this technique – desperate as it seemed to us - actually worked.

In later years we saw some beautiful examples of electron microscopic economy by using tiny samples of paper-thin aortic valves from hypercholesterolemic animals. The excellent electron micrographs of "liposomes" raining into the vascular wall across an intact endothelium are to this day the best representation of the earliest arteriosclerotic lesion visible by electron microscopy.

We also witnessed the hardships of living under the dictatorship: the daily, even hourly hardships were so far removed from all that is normal - and human - that today they seem unthinkable. Yet Nicolae was unbendable, and so was Maya, his essential partner in science and in life. The unrelenting sense of humor of Nicolae may have helped to save him; but the risks he took were a daily event. Maya and Nicolae refused to receive the extra food rations allotted to the friends of the regime. As Director of the Institute, Nicolae was obliged to hang the dictator's portrait in his office. He hung it somewhere outside, and pointed it to visitors by saying: "Wrong Nicolae".

To researchers of the new generations, working peacefully at their research benches, it may be impossible to imagine what it meant to do experiments on those same benches, in the same laboratories - under a dictatorial regime. A crisis could happen at any moment. Nicolae had to be ready at all times to put out a fire whenever a call came from the State. One day, for example, it was hinted that the Institute might

microscopie electronică erau fixate în osmium, acest reactiv era re-extras şi refolosit. Judecând după rezultate, această metodă – disperată, după cum ni s-a părut nouă – a dat rezultate.

În anii din urmă am văzut rezultate splendide ale microscopiei electronice realizate în Institut asupra valvelor aortice ale animalelor cu hipercolesterolemie. Micrografiile electronice ale “liposomilor” peretelui vascular, situaţi sub un endoteliu intact sunt pâna astăzi cea mai buna reprezentare a leziunilor aterosclerotice incipiente vizibile prin microscopie electronică.

Noi am fost şi martorii tipurilor grele trăite sub dictatură: greutăţile zilnice sau chiar ale fiecarei ore erau aşa de departe de tot ce este normal şi uman, încât azi par a fi de necrezut. Nicolae era intransigent şi la fel şi Maya, partenera sa esenţială în ştiinţă şi în viaţă. Umorul nestăvilit al lui Nicolae l-a ajutat poate, dar riscurile erau zilnice. Maya şi Nicolae au refuzat raţiile suplimentare oferite prietenilor regimului. Ca Director al Institutului, Nicolae era obligat să afişeze portretul dictatorului în biroul sau. El a pus portretul undeva afară şi-l arăta vizitatorilor spunând: "Wrong Nicolae".

Pentru cercetătorii noilor generaţii care lucrează linistiţi la mesele de laborator este imposibil, poate, să-şi imagineze cum era să efectuezi experimente la aceleaşi mese, în acelesi laboratoare, sub un regim dictatorial. În orice moment putea apărea un moment de criză. Nicolae trebuia să fie pregătit. De exemplu, într-o bună zi a aflat că Institutul va fi dărâmat imediat, deoarece interfera în priveliştea viitoare de la ferestrele Palatului Poporului. Încearcă sa faci un experiment când o astfel de perspectivă pluteşte în aer!

Poate este bine să uităm acele vremi – dar nu trebuie să uităm niciodată curajul celor care au ţinut făclia pe drumul drept şi corect în timp

be destroyed immediately because it interfered with the planned view from the windows of a State palace. Now try to do an experiment while this kind of news is in the air. It may be all right to forget those times - but we should never forget the courage of those who held the tiller on the right course, during the long storm. It was that kind of selfless courage that is called heroism.
The year 1995 brought a cruel blow: Nicolae was suddenly taken away. Maya was admirable, as usual. In typical Simionescu style, she is carrying on by working for two, with the energy that must have driven the Daci among her ancestors.

We are proud of being her friends and friends of the Nicolae Simionescu Institute for Cell Biology and Pathology - a center of excellence for science - and for humanity.

de furtună. Acest tip de curaj, mergând pâna la uitarea de sine, se numește eroism.
Anul 1995 a adus o lovitură cruntă: Nicolae a plecat brusc dintre noi. Maya a fost de admirat, ca de obicei. În stilul tipic Simionescu, ea a continuat să lucreze cât doi, probabil cu energia pe care au avut-o Dacii, printre strămoșii ei.

Suntem mândri de a fi prietenii ei și ai Institutului de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" – un centru de excelență pentru știință și pentru relațiile umane.

Mesaj la a 25-a Aniversare a IBPC-NS - 2004

Prof. Morris Karnovsky

Dear friends in Bucharest,

I well remember the Meeting at the Institute years ago.
The Simionescu's were wonderful hosts, the science was excellent- but, for me, the most exciting aspect was meeting young investigators from the Institute, whose enthusiasm, energy, and passion for science was inspiring. Their accomplishments, despite sometimes adverse circumstances, were memorable. Despite the difficulties, Maya's and Nicolae's elegance and gaiety - apart from their astuteness in directing scientific projects - was an inspiration for anyone.,
It is good to know that the Institute has thrived through thick and thin times, that it has been recognized as a Center of Excellence, as has had other accolades.

Happy 25th birthday! May you all continue to thrive! All best wishes, and
with fond memories,

Dragi prieteni din București,

Îmi amintesc foarte bine Sesiunea Științifică din Institut, care a avut loc cu ani în urmă. Profesorii Simionescu au fost gazde excelente, nivelul științific a fost excelent, dar pentru mine aspectul cel mai interesant a fost întâlnirea cu tinerii cercetători ai Institutului. Entuziasmul, energia și pasiunea lor pentru știință a fost extraordinară. Cu toate adversitățile timpului, realizările lor au fost memorabile. Și, înfruntând toate dificultățile, Maya și Nicolae au direcționat proiectele științifice cu inteligență și inspirație, dar și cu eleganță și jovialitate, fiind un exemplu pentru fiecare din noi.
Institutul s-a dezvoltat și a prosperat în vremuri grele și în vremuri mai bune și azi este Centru de Excelență alături de alte onoruri primite.

La mulți ani la a 25-a aniversare! Să trăiți și să înfloriți! Toate cele bune.
Cu amintiri frumoase,

Prof. J. David Castle

Universitatea din Virginia. USA

Amintiri despre Institutul de Biologie și Patologie celulara și despre fondatorii săi

Fondatorii IBPC, Nicolae și Maya Simionescu mi-au fost colegi, prieteni apropiați, și, in multe privințe, cel de-al doilea rând de părinți în cea mai mare parte a carierei mele științifice. Eram absolvent și studiam cu George Palade și Jim Jamieson la Universitatea Rockefeller, când l-am cunoscut pe Nicolae și apoi pe Maya, care începuseră acolo studiile asupra structurii fine și permeabilității microvasculaturii.

În anii care au urmat am participat împreună la nașterea biologiei celulare moderne. În timp ce eu eram interesat de explorarea zonei distale din calea de secreție în celule exocrine, am fost martorul explorării sistematice a permeabilității capilarelor în stilul Simionescu, și la definirea variatelor forme ale transcitozei care sunt astăzi recunoscute ca proprietăți ale endoteliului. La acea vreme Rockefeller era paradisul nostru intelectual, un loc de refugiu întrun oraș tumultos, un loc unde eram uniți prin dragostea pentru biologia celulară și eram feriți de orice alte lucruri exterioare care ne-ar fi distras atenția. În multe privințe cred ca acest mediu a servit ca model pentru ceea ce a creat Nicolae și Maya la IBPC în București.

În 1973, Nicolae, Maya și eu ne-am "transcitat" împreună din New York la New Haven. Mutarea la Facultatea de Medicina,Univ. Yale a fost importană pentru IBPC în cel puțin două privințe: prima, a marcat începutul perioadei când "discipolii" Simionescu au fost trimiși la laboratoare internaționale, în scopul de a forma conducători de grupuri de cercetare pentru viitorul Institut; a doua, a fost locul în care cei doi Simionescu au început cea de-a doua carieră, ca arhitecți și fondatori ai IBPC.

Îmi amintesc creionarea viitorului Institut de către echipa științifică de renume a celor doi Simionescu, alegerea înțeleaptă a direcțiilor științifice, discuțiile periodice cu George Palade; pentru mândrii părinți, procesul de naștere al IBPC a semănat cu nouă ani de eforturi....(în loc de o gestație de... nouă luni).

Interacția mea cu cei doi Simionescu la Yale a avut și o conotație personală importantă, deoarece m-am întors în 1978 în calitate de cadru didactic de Biologie Celulară, iar Nicolae a fost mentorul meu în primul an de predare la studenții mediciniști. Îmi sunt vii în minte până azi lucrurile pe care le-am învățat sub conducerea sa – descrierea logică și ierarhică a organizării secțiunilor histologice, discutarea funcției fiziologice în contextul structurii, și rolul acestui eșafodaj pentru înțelegerea patologiei țesuturilor. Sunt sigur că mulți dintre dumneavoastră înțeleg ce vreau să spun! și azi continui să-i fiu recunoscător lui Nicolae care a menținut standardul meu educațional la cel mai înalt nivel. Și tot acum, la împlinirea a 25 de ani de profesorat la Facultatea de Medicină, continui să folosesc cu mândrie bogatul set de ilustrații splendide din capitolul celor doi Simionescu din Manualul clasic de Histologie editat de Weiss și Greep.

Deși încă nu am vizitat IBPC, experiența mea cu Nicolae și Maya m-a făcut să apreciez în mod deosebit modul în care poți trăi la un nivel științific ridicat și în care poți aduce contribuții științifice valoroase. IBPC, o temelie științifică modernă dedicată înțelegerii proceselor biologiei celulare și a celor patologice este astăzi după 25 de ani, Centru de Excelență al Comunității Europene,

fapt cu adevărat remarcabil. Acest Institut este o moştenire concretă, rezultat al combinării viselor, viziunilor, descoperirilor, creativităţii şi perseverenţei. Este un model viu pentru fiecare din noi.

Închei cu urarea de felicitări din inimă, şi urez IBPC inspiraţie şi succese şi în următorii 25 de ani!

Prof. Nicole Suciu Foca,
Columbia Univ. New York, USA

Memories of Maya and Nicolae Simionescu

Celebrating 25 years from the creation of ICBP "Nicolae Simionescu" is an important moment in the history of Romanian Science, hopefully also of the Romanian Revolution. It illustrates the best of what our people can offer: tenacity, courage, optimism and creativity.

I have known the Simionescu couple for about half a century. Maya was my school mate in the University of Bucharest and like me she was victimized in the late 50s, when the government decided that we and our families were political enemies. Years of persecutions followed, yet eventually we graduated and made our careers.

When Nicolae Simionescu fell in love with Maya, he was already an established investigator in the Institute of Endocrinology and well respected in the Romanian scientific world as well as abroad. Maya was a brilliant young graduate anxious to learn more about science. They were soon invited by George Palade, the Nobel Laureate, to work with him at the Rockefeller University in New York. And it was there that I met them again in 1969.

Their accomplishments and life together is a beautiful and romantic story not only of love, but also of dedication to science and its future in Romania

Aniversarea a 25 de ani de la creerea Institutului de Biologie şi Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" este un moment important în istoria ştiinţei din România, şi din fericire, şi din cea a Revoluţiei române. Creerea acestui Institut ilustrează foarte bine ceea ce poate oferi mai bun poporul român: tenacitate, curaj, optimism şi creativitate.

Îi cunosc pe cei doi Simionescu de aproape o jumatate de secol. Maya a fost colega mea de faculatate la Universitatea din Bucureşti, şi, la fel ca mine a fost victimizată la sfârsitul anilor '50, când guvernul a decis că familiile noastre sunt duşmani politici. Anii de persecuţii au continuat dar, final noi am absolvit facultatea şi ne-am făcut carierele ştiinţifice.

Când Nicolae Simionescu s-a îndrăgostit de Maya, el era deja cercetător la Institutul de Endocrinologie şi era un nume respectat atât de comunitatea ştiinţifică româna cât şi internaţională. Maya era o absolventă strălucită, dornică să înveţe cât mai mult în ştiinţă. Apoi, Profesorul George Palade, Laureat al Premiului Nobel, i-a invitat să lucreze cu el la Universitatea Rockefeller din New York. Acolo i-am reântalnit în 1969.

Realizările şi viaţa lor împreună este o poveste romantică minunată nu numai pentru ce înseamnă dragoste dar şi pentru dedicaţia lor pentru ştiinţă şi pentru viitorul ştiinţei în România, pentru că în acele timpuri ştiinţa nu avea nici un viitor la noi. Am venit în America prin câştigarea unei burse Roosevelt, iar soţul meu a sosit după un an. Am lăsat în urma noastră în ţară copii, părinţii noştri şi toţi ceilalţi prieteni şi

because at that time there was no future! I came to the USA after winning a Roosevelt fellowship. My husband managed to join me after one year. We left behind our children, parents and all the rest of our friends and family. There was a mountain of difficulties to climb before starting a new life in America. Tears and sweat for years to come, yet from the very beginning we felt that only in America and from America could we help our families to live a decent life. We discussed our options with the Simionescus. They were equally aware of the impossible struggle they would face trying to live their dreams of science and prosperity back home in Romania. They had innumerable opportunities to remain in USA as professors in any of the elite universities. They had worked at Rockefeller, Yale and Columbia University making seminal contributions to the understanding of the mechanism of endothelial cells function under normal and pathological conditions. Their studies were and are crucial to progress in the development of new therapy for an endless number of diseases caused by inflammatory changes in endothelial cells. They have established the cause-effect relationship of many of these pathological changes. Their publications in the most renowned journals have become classics of cell biology.

This was well appreciated in USA where they spent years as visiting professors and where they had the tools to do their research. Aware that none of these tools were available in Romania, they decided to raise the funds to equip the laboratories and build the Cell Biology Institute of their dreams. Their name in USA was so prestigious that fellowships were offered to their students to study and work on the projects that they had initiated in host American laboratories. And then, the students received offers they could not refuse: positions, good salaries and a better life in USA.

membrii de familie. În fața noastră, în America am avut de surmontat dificultăți, au fost lacrimi și mult efort în anii ce au urmat, dar din primul moment am simțit că numai în America și din America ne putem ajuta familiile să traiască o viață decentă. Am discutat opțiunile noastre cu cei doi Simionescu. Ei își dădeau seama de lupta imposibilă pentru știință și o viață decentă în România. Sotii Simionescu au avut nenumărate ocazii de a rămâne ca profesori în SUA în oricare din universitățile de elită de acolo. Au lucrat la Universitățile Rockefeller, Yale și Columbia aducând contribuții esențiale la înțelegerea mecanismelor de funcționare ale celulei endoteliale în condiții normale și patologice. Cercetările lor sunt esențiale pentru progresele în introducerea de noi terapii pentru nenumarate maladii care implică modificări de tip inflamatoriu în celulele endoteliale. Lucrările publicate de ei în reviste de specialitate de renume sunt azi clasice pentru biologia celulară.

Aceste lucruri au fost apreciate în SUA, Profesorii Simionescu fiind ani la rând Profesori-invitați si realizând cercetări împreună cu colegii americani cu cele mai avansate tehnologii de investigare în biologia celulară. Conștienți de faptul că aceste tehnologii nu erau disponibile în România, ei au decis să caute fonduri pentru echiparea laboratoarelor și să clădească Institutul de Biologie Celulară pe care-l visau. Renumele lor în SUA a fost atât de prestigios încât au obținut burse pentru cercetători în scopul de a studia și a lucra în proiectele inițiate de Profesorii Simionescu în laboratoarele americane. Și apoi, cercetătorii au primit oferte pe care nu le puteau refuza: poziție, salariu bun și o viață mai bună în America.

Promisiuni care nu s-au ținut și mari probleme financiare au fost numai o parte din prețul plătit pentru a duce știința înapoi în România și pentru

Deserting students, broken promises, hardship and great financial problems were just part of the price they paid for bringing science to Romania and building their Institute. Eventually this fight broke Nicolae Simionescu's heart. Fame and honor did not spare his health and so he paid the ultimate price, his life. Maya was left with the overwhelming challenge of continuing her monumental work and overcome her sorrow. Her courage came from her dedication to her late husband's memory. She has continued to do outstanding research, pioneering in the field, publishing in the best journals and competing with leading laboratories from USA and Western Europe.

The Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" has not only survived but has become first-rate. It now has an address: Bucharest, Romania not Bucharest, Hungary as it was written on the request for reprints of my Nature papers until 1969 when I left. And so, the Institute's history is a beautiful story of triumph of love and science in spite of all the vicissitudes.

Fellow Romanians, don't you think that the story of Nicolae Simionescu and his Institute is reminiscent of that of "Meşterul Manole"? Tell the story to visitors from abroad since they may also hear the voices coming from the walls of our monuments.

a creea Institutul. Final, în această luptă a cedat şi inima lui Nicolae Simionescu. Faima si reputaţia nu i-au cruţat inima, astfel încât el a platit ultimul preţ, viaţa sa. Maya a rămas pentru a continua lucrarea monumentală şi a trece peste acestă durere. Curajul şi l-a găsit din dedicaţia pentru memoria soţului său. Ea a continuat să facă studii eminente, unele chiar de pionierat, să publice în cele mai reputate reviste de specialitate şi să competiţioneze cu laboratoare de vârf din SUA şi din Europa de vest.

Institutul de Biologie şi Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" nu numai a supravieţuit dar a devenit un Institut de prim rang. Adresa sa este: Bucureşti, România nu Bucuresti, Ungaria aşa cum era scris pe cererile de extrase de pe lucrările mele din Nature până în 1969, când am plecat. Şi astfel, istoria Institutului este o poveste minunată despre triumful dragostei şi al ştiinţei asupra vicisitudinilor.

Colegi români, nu credeţi că povestea lui Nicolae Simionescu şi a Institutului său seamănă cu cea a Meşterului Manole? Povestiţi-o vizitatorilor dumneavostră de peste hotare pentru că ei poate vor auzi vocile care vin din pereţii monumentelor noastre.

Prof. Nicole Suciu-Foca

Corina Neacsu,
Grafician IBPC-NS

O ALTĂ LUME - Amintiri

Institutul de proiectare unde lucram când am aflat de postul de la Institutul de Biologie şi Patologie Celulară avea dificultăţi în procurarea unor noi proiecte. Se vorbea de detaşarea unora dintre noi la Piteşti, aşa că eram dispusă să mă mut, oarecum, oriunde.

Când am ajuns în faţa institutului, nu mi-a venit să cred că aşi putea avea norocul să lucrez într-o clădire atât de frumoasă şi am ezitat să intru, dar pentru că tot făcusem drumul, am îndrăznit şi primul om la care am fost îndrumată a fost Doamna Maya. Era în holul de la intrare, o doamnă slăbuţă, cu o privire vie, îmbrăcată cu o fustă neagră cu trandafiraşi şi un tricou alb cu aceeaşi bobocei de trandafir. M-a cucerit această prezenţă atât de feminină, dar am intrat în panică aflând că e soţia directorului. Nu-mi amintesc tot ce am vorbit cu dânsa, dar reţin că mi se adresa foarte natural. M-a rugat să dau o probă de scris, dar îmi tremura atât de tare mâna, încât dânsa dorind să mă scoată din dificultate, m-a întrebat dacă nu am vreun desen făcut de mine sau ceva scris. Salvarea a venit de la agenda mea de telefon, ponosită, dar scrisă în momente de calm. Mi s-a adus apoi un vas de plastic pe care am scris cu un marker numărul 103, adică Laboratorul de organele, pe atunci. M-au lăsat singură, m-am liniştit şi totul a ieşit bine.

Am aflat că deşi dânsa mă acceptase, trebuia să merg şi în audienţă la Domnul Profesor. Audienţele se ţineau în după amiaza zilei următoare. Când am ajuns, era plin de oameni în hol şi am fost îndrumată către secretariat, unde trebuia să confirm sosirea. Acolo era un domn sobru, impecabil îmbrăcat cu cămaşă alba, sacou şi cravată (era vară). Văzând aşa un secretar, m-am întrebat, oare cum o fi directorul. Când am [nceput să lucrez în institut, am constatat că distinsul "secretar" nu era altul, decât Doctorul Hillebrand, care în acea după amiază fusese de gardă. Domnul Profesor, o prezenţă ieşită din comun, un interlocutor ferm şi totuşi uman, după ce a aflat ce am lucrat până atunci, mi-a dat să desenez un suport de plastic, pe care era o rolă consumată de scotch. Am mers într-un laborator, unde mai erau două desenatoare, tot cu câte un suport în faţă. După ce am revenit la Domnul Profesor în cabinet, mi s-a părut corect să-i reamintesc ce salariu aveam şi am comentat jenată că nu cred că-mi va putea da la fel de mult ca să desenez asemenea nimicuri. La fel de impenetrabil mi-a mulţumit şi mi-a spus să aştept un răspuns acasă. Am plecat foarte descumpănită şi mare mi-a fost nedumerirea când spre seară am primit un telefon prin care eram invitată să vin a doua zi să-mi iau hârtiile prin care solicitam transferul. Aşa am ajuns eu la Institutul de Biologie şi Patologie Celulară.

devină realitate, prima condiţie este aceea de a avea o mare capacitate de a visa; a doua este perseverenţa, adică încrederea în vis".

Institutul de Biologie şi Patologie Celulară "N. Simionescu" a avut şansa ca fondatorii săi să-i aşeze la temelie aceste două preţioase pietre.

"LA MULŢI, MULŢI ANI !"

Dr. Doina Velican,
Membru al Academiei de Ştiinţe Medicale

Mărturie pentru: UN VIS DEVENIT REALITATE: Institutul de Biologie şi Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"

1979. într-o dimineaţă, pe o vreme plumburie ca şi vremurile de atunci, Dr. Constantin Velican mi-a spus: "Vino să-ţi arăt cum se înfiripă un miracol!". Cu scepticismul celui care, de la Eminescu citire, ştia că "minuni în vremea noastră nu cred a se mai face", am ajuns în Str. B. P. Haşdeu, la nr. 8.

O clădire mare, aparent impersonală, în care, pe culoare şi pe scări erau grămezi de moloz şi, ca într-un joc al umbrelor, era un du-te - vino de lucrători, cu saci de nisip în spate şi cutii de vopsele în mâini. Într-o cameră mică, în semiobscuritate, printre lăzi şi cutii nedespachetate, ne-a întâmpinat Dr. Neacşu, care a pus pe o măsuţă un sul de hârtie grosieră şi uşor cafenie. Părea că provine de la ambalajul unui aparat.

După câteva minute, sulul de hârtie desfăşurat s-a însufleţit şi au început să apară linii, schiţe, notiţe, scrise în toate sensurile. Ni s-a spus: "Acestea sunt planurile trimise de Prof. Nicolae Simionescu şi Maya, pentru viitorul Institut de Biologie şi Patologie Celulară". Brusc, camera parcă s-a luminat şi, undeva, departe, am văzut cu ochii minţii silueta unui edificiu şi a unei instituţii moderne, dedicată cercetării ştiinţifice, aşa cum visam cu toţi.

Au trecut ani şi prin eforturile uneori sisifice, ale fondatorilor, Institutul a prins viaţă. Aparatura de înaltă tehnicitate şi-a găsit locul în camerele, acum luminoase şi vesele că sunt "locuite" de tineri, recrutaţi dintre cei mai buni absolvenţi ai Facultăţilor de Biologie, Biochimie, Fizică ş.a. Trimişi la specializare în institute şi centre de cercetare renumite din toată lumea, aceştia se întorceau acasă pentru a contribui la dezvotarea ştiinţei româneşti.

În amfiteatrul cu scaune tapisate într-un galben luminos, dătător de speranţe, s-au perindat figuri ilustre ale comunităţii ştiinţifice internaţionale, unele purtând aura premiilor Nobel. Au putut fi audiate prelegeri şi cursuri, lucrări, prezentate de Profesorii George Emil Palade, Christian de Duve, Guido Majno, Isabel Joris ş.a.

Conferinţele internaţionale organizate cu periodicitate regulată, Sesiunile Anuale ale Institutului au fost adevărate sărbători care au reuşit să pună în vibraţie comună pe cei din afară cu cei din ţară.

Dorind să formeze "creatori de ştiinţă, sensibilizaţi şi fertilizaţi prin cultură" (cuvântul Acad. Nicolae Simionescu la comemorarea lui Eminescu în 1989), Profesorii Nicolae şi Maya Simionescu au ţinut strânsă echipa institutului şi pe prietenii lor şi cu prilejul aniversărilor culturale, al sărbătorilor naţionale şi personale.

… Dar, "mult prea repede trecătorul timp" nu iartă. Barca institutului, care înainta cu vântul în pânze, a pierdut unul din cei doi timonieri. Cel rămas, Acad. Maya Simionescu, păstrând durerea pentru sine, şi-a strâns puterile şi a ţinut ferm şi drept drumul institutului.

Hans Selye spunea: "Pentru a face un vis frumos să devină realitate, prima condiţie este aceea de a avea o mare capacitate de a visa; a doua este perseverenţa, adică încrederea în vis".

Institutul de Biologie şi Patologie Celulară "N. Simionescu" a avut şansa ca fondatorii săi să-i aşeze la temelie aceste două preţioase pietre.

"LA MULŢI, MULŢI ANI !"

Dr. Constantina Heltianu,
IBPC-NS

Amintiri răsleţe

Primii paşi în cercetare i-am făcut în Institutul de Endocrinologie "C. I. Parhon" din Bucureşti. Dupa câteva luni de la venirea mea, în amfiteatrul Institutului s-a desfăşurat o sesiune ştiinţifică de comunicări. A fost prima mea participare la o astfel de manifestare. Aproape de începerea sesiunii a intrat în amfiteatru un bărbat cu fruntea înaltă, cu părul uşor grizonat la tâmple, purtând un halat alb impecabil. La trecerea lui printre rândurile de scaune, o scânteie nevazută parcă a electrizat sala. Cu toţii am amuţit şi am aşteptat cu nerăbdare prelegerea lui. Am întrebat pe un coleg din dreapta mea. Cine este ? El este Doctorul Nicolae Simionescu, un mare specialist endocrinolog, de care sigur vei mai auzi. Cu sufletul la gura urmăream expunerea. Totul era nou pentru mine. Dupa câteva luni am aflat că plecase în Statele Unite împreună cu sotia lui, Maya Simionescu, cercetătoare in biologie. Ce departe! Oare se mai întorc?

.... şi totuşi s-au întors. Chiar au avut curajul în vremurile acelea să înfiinţeze un nou institut, Institutul de Biologie şi Patologie Celulară. Cum am aflat de înfiinţarea acestui institut, m-am prezentat la un interviu pentru angajare chiar la dânsul, Domnul Simionescu. Ce noroc am avut ! M-a acceptat în echipa de cercetare nou formată. Nici nu am realizat în acel moment că acest "acceptat" îmi va schimba total destinul meu profesional.

Au trecut câteva luni bune de la angajarea mea în noul institut, timp în care soţii Simionescu predau biologie celulară în Statele Unite, iar noi cei de acasă ne familiarizam cu sistemul cardiovascular. Şi au venit acasă din depărtări. Un nestâmpăr lăuntric m-a cuprins, să mă duc să-i vad. Cabinetul Domnului Profesor era la parter, nu avea secretară, după două rotocoale pe culoar mi-am luat inima-n dinţi, am ciocănit la uşă şi am intrat. Domnul Profesor avea un musafir (de la Partid). M-am fâstâcit şi-am îngânat « Să ne trăiţi Domnule Profesor, ce bine c-aţi venit să ne-apucăm de lucru ».

..... Şi a început povestea receptorului la histamină. În una din zile Domnul Profesor Simionescu mi-a arătat o imagine de microscopie optică dintr-o lucrare a dânsului, recent publicată. Aceasta reprezenta un diafragm de la un şoarece injectat intra venos cu o substanţă de contrast. În urma incubării diafragmului cu histamină s-a observat o marcare specifică a venulelor. Şi Domnul Profesor mi-a zis : « ...Ce-ar fi să prepari un complex care să fie şi electrono-opac şi să conţină şi histamină. Folosirea lui cred ne va duce spre descifrarea mecanismului de interacţie dintre histamină şi celulele endoteliale din microvasculatură. S-ar putea să existe receptori la histamina pe membrana endoteliului vascular. Parcă şi văd o decorare a venulelor din diafragm cu complexul, ca şi în această fotogramă.. ».

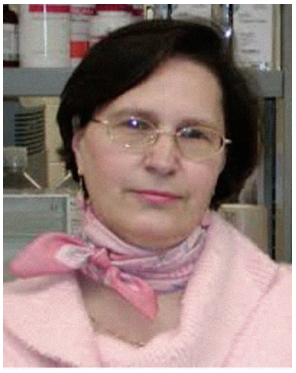
Profesorul avea un dar teribil să te facă să-ţi imaginezi experimentele. Cu prepararea conjugatului mai mergea, cum mai mergea, că mă pricepeam, dar ce te faci cu şoriceii, că trebuie să le faci operaţie. Cu mult profesionalism, şi multă amabilitate Doamna Maya mi-a arătat cum să procedez. Mă fascina eleganţa şi precizia cu care lucra. După opintelile începutului, ce şi-a imaginat Domnul Profesor a devenit realitate. Ne-am bucurat de această realizare. Cu toţii am ridicat o cupă de şampanie pentru reuşita proiectului.

.....Din păcate, Profesorul nostru nu mai este, dar spiritul lui parcă este mereu cu noi. Şi mi-l imaginez ca o inimă mare care pulsează continuu, viaţă, ştiinţă, putere, prin ramuri tinere în formare, ...şi rânduri, rânduri de ramuri se formează din nou.

Dr. Nicanor Moldovan și
Dr. Leni Moldovan,
Ohio State University, Columbus, USA.
Alumni IBPC-NS

"AMINTIRI LA UN SFERT DE VEAC - IBPC NS 1979- 2004"

Suntem dintre cei care cunosc (și recunosc) din proprie experiență caracterul unic al Institutului, dat de modul cum a fost conceput, organizat și condus, în intenția de a-i forma pe membri săi ca oameni de știință. Activitatea de laborator, seminariile, discuțiile periodice, redactarea lucrărilor, simpozioanele internaționale, activitățile culturale - toate au avut marca personalităților inconfundabile ale creatorilor lui. Fiind totdeauna alături, ei și-au pus amprenta de savanți, de profesori și de oameni de cultură pe Institut, adică pe noi cei care am avut șansa de a lucra acolo.



E foarte greu să alegem acum între miile de amintiri care ne leaga de acele zile de aur ale Institutului. Dar să luăm, de exemplu, examenele de doctorat (de admitere, sau colocviile). Pentru noi, candidații, pregătirea acestor examene a fost ca a doua universitate, confirmând misiunea Institutului de a fi nu numai o unitate de cercetare de nivel mondial, dar și una de învățamant, la același nivel.

Ni s-a dat mult și ni s-a cerut mult. Au fost trei elemente care au contribuit la asta: 1) Programa, care a făcut o acoperire excelentă a biologiei celulare, văzuta din launtrul ei, ca de cei care au contribuit la însăși formarea disciplinei; b) Biblioteca, dotată cu revistele și tratatele de baza ale domeniului; c) "Sala de consiliu", unde s-a putut consulta publicațiile de ultima oră, o colecție impresionantă de reprinturi cerute de noi prin "Current Contents", într-o vreme când puțini oameni de știință din Europa de est abia auziseră de acest sistem de informare. In particular, un mare impact credem că l-a avut folosirea ca referință a manualalului "Molecular Biology of the Cell" de Alberts et al., până azi nedepășit decât de re-editările lui îmbunătățite. De aceea, fiecare examen a fost pentru noi o sărbătoare, căci ne justifica dedicarea unei cantități apreciabile de efort lecturii și studierii lui 'Alberts'. Aceste ocazii ne creau o imensă satisfacție, deoarece puteam să înțelegem un mare număr de lucruri despre care aflăm de ce sunt așa cum sunt. De asemenea iluminante erau pentru noi examenele orale, adevărate dialoguri unde învățam despre subiecte mai mult chiar decât spuneam!

In Institut se muncea serios, dar se și… juca serios! Mai puțin în pauze, dar cu siguranță în 'programul" de tenis de câmp inițiat chiar de domnul Profesor și de doamna Maya. Așa ne-a adus în conștiință nevoia exercițiului fizic și a relaxării mentale, atât de necesare vieții moderne dar atât de străine spiritului de înregimentare socalistă. Terenurile selecte de la "Tenis Club", atmosfera destinsă, neprotocolară, unde am întrezărit dimensiunile umane atât ale colegilor noștri, cât și ale familiei Simionescu. Ne stimulau și înclinațiile speciale pentru tenis ale lui Mugurel Badea și ale lui Victor Jinga, care povesteau despre mirifice terenuri și meciuri amicale de peste ocean, în vremea șederii lor în America.

S-a întâmplat odată ca nici unul din colegii noștri nu a venit la tenis într-o duminică după-amiază, decât eu (NM). Domnul Profesor și doamna Maya au venit însă. Obișnuiam să jucăm dublu și înainte, dar acum situația era destul de incomodă pentru mine. Eu eram un începător, care făcea ce-i stătea în putință de unul singur, ceea ce nu însemna prea mult: alergam mult pe teren, nu cu prea mare folos, dar faceam față.

Domnul Profesor a realizat că va fi dificil pentru mine, dar a vrut probabil să mă încerce. M-a întrebat dacă vreau să joc și am acceptat provocarea. Era o

împrejurare când eram testat dincolo de capacitățile mele obișnuite. Am simțit că domnul Profesor vrea să îmi dea o lecție, să îmi arate că dacă am încredere că pot, voi reuși; și să nu mă las intimidat de situație, care era destul de jenantă pentru mine (ținând cont de timiditatea mea înnăscută).

Spre mirarea și încântarea mea, jocul a mers bine. Curând m-am încălzit și simțeam că 'dau' din mine mai mult ca de obicei, nu atât cât credeam eu că pot, ci atât cât domnul Profesor îmi cerea. Mă simțeam din ce în ce mai bine, și cred că n-a fost o partidă slabă. Dar mesajul a fost clar pentru mine; "Crezi că poți, și vei putea!".

Ce bine era dacă aș fi pus asta în practică de atunci…Dar mai târziu, mi-am amintit de această împrejurare de multe ori. Domnul Profesor mi-a pus în mână cheia sucessului (și) pe terenul de tenis; rămânea doar să o folosesc, la timpul potrivit.

O altă împrejurare, asemănătoare, a fost legată de ieșirea la ski la Poiana Brașov. Învățasem să skiez de curând, și, din nou, activitatea era o solicitare dincolo de domeniul obișnuitului. Domnul Profesor și doamna Maya erau printre noi și ne urmăreau atenți. Pe pârtia de la Drumul Roșu, am trecut de câteva ori zburând ca vântul. Poate m-aș fi oprit în vreun brad, dar gândul că iată, e alt test pe care e bine să-l trec și că pot să-l trec ("dacă și Profesorul crede asta!") mi-a dat siguranță. Și într-adevăr, domnul Profesor a părut plăcut surprins de cum skiam, pentru că eram, evident un începător dar curajul ținea locul experienței și mi s-a părut că apreciază asta în mod deosebit. Celor ce eram pe pârtie la ora aceea ne-a spus "zmei" și ne-am simțit mândri de asta. Încă o dată domnul Profesor își exersa carisma formatoare, arătându-ne chiar prin propriile noastre confruntări cu necunoscutul și cu pericolul ceea ce are, într-adevăr, valoare.

Domnul Profesor era uneori, mai ales în ultima perioadă, preocupat și îngândurat. Simțeam că pe umerii lui stăteau grave probleme ale științei, ale administrației și ale politicii, și poate ale sănătății. Asta îl făcea să pară distant câteodată, dar am avut prilejul să mă conving că asta nu era decât o aparență. Într-o după-amiază am fost programat la o discuție în biroul dumnealui (cel nou). Cred că avea să-mi spună, sau să mă întrebe ceva despre organizarea unei comemorări, ca de exemplu cea a lui Brâncuși, sau poate a unei zile a Institutului; nu mai știu. Dar îmi amintesc că acum, că după subiectul propriuzis, domnul Profesor nu m-a 'expediat' ci a început să-mi povestească altele, tot legate de cultura. Mi-a spus de exemplu, ce mult îi place să asculte 'Concertul pentru vioară' de Bruckner și despre faptul că în viață a scris și chiar a publicat literatura, sub pseudonim…Până azi am rămas cu dorința de a afla care au fost acele cărți, (sau poezii?) și care a fost numele lui de literat…

Printre multe alte momente remarcabile din acea vreme, întoarcerile în țară ale Profesorului și doamnei Maya din America, unde mergeau în fiecare an pentru un semestru universitar, erau adevărate evenimente. Mergeam să-i așteptăm la aeroport după Anul Nou, cândva prin ianuarie. Pentru noi, cei neieșiți din țară, însuși aeroportul era ceva misterios, chiar periculos. Securitatea mișună peste tot și paza strictă arată cât de mult 'lagărul socialist' era de fapt, un lagăr!

Ceea ce ne-a uimit și ne-a încântat întodeauna era că domnul Profesor și doamna Maya reveneau, cu regularitate de anotimp, în lagăr. Ne era și nouă clar că o făceau din ce în ce mai greu, dar trăiam cu sentimentul că de fapt, noi reprezentam familia lor lărgită și întoarcerea la București era pentru dânșii de două ori o întoarcere acasă…și nu veneau niciodată cu mâna goală: cadourile noastre erau tonele de chimicale, de instrumente și mai les de cărți și de reviste reprezentau adevăratul 'combustibil' al Institutului, pe ani de zile. Alt combustibil nu prea

aveam: înghețam în hainele de ski în Institut, pentru ca se 'tăiase' căldura, încât precipitau soluțiile de SDS în tampoanele de electroforeză…! Iar dr. Sampath Parthasarathy care venise la unul din simpozioane, l-a întrebat pe Aurelian Radu pe Calea Victoriei, seara, în taxiul de la aeroport: "Am ajuns oare în București…?". Gândindu-se poate la acest întuneric, când ne-a revăzut la aeroport, doamna Maya a oftat: "Dacă ați vedea cum sunt pomii de Crăciun în America… Câte lumini, câtă feerie!".

Ne gândim acum că poate dorința unora dintre noi de a lucra în Occident a fost (desigur, involuntar) cultivată de aceste adevarate spectacole ale revenirii. Multe lucruri pe care le-am auzit de la dânșii, atunci și cu alte ocazii, ne-au stârnit curiozitatea.

Dar când am ajuns dincoace de Ocean, am putut cunoaște realitatea, nu așa de grozavă peste tot. Ne-am spus apoi de multe ori, cu naiva uimire, că lucrurile "vai, nu sunt ca în Institut"! Căci Institutul a rămas și va fi întodeauna pentru noi, sistemul de referință.

Da, viața merge înainte, ca vârful copacului care crește. Dar se poate desprinde vreodată
vârful de rădăcini?

Dr. Ileana Mânduțeanu,
IBPC-NS, m.c. Academia Romana

Lecţiile Domnului Profesor

Aduceri aminte și reflecții. Imagini persistente în memorie. Gânduri care recompun perioada de început, dominată de personalitatea d-lui Profesor Nicolae Simionescu. Au fost « Lecțiile D-lui Profesor ».

Naşterea unui cercetător - atribuirea temei de cercetare

Noul venit trece printr-o perioadă de probă de 6 luni și se familiarizează cu tehnicile și temele din toate laboratoarele Institutului. Apoi, «marele moment» : fiecare dintre noi este chemat la D-l Profesor care decide laboratorul unde ești repartizat, colegul cu experiență cu care vei lucra și, poate cel mai important lucru, tema proiectului pe care urma să îl realizezi.

Tema mea se intitula : «Izolare, cultivare și metabolism al celulelor endocardice». Entuziasm, dar și puțină teamă. Stiam că acest tip de celule nu mai fuseseră cultivate, exista putină literatură în domeniu și trebuia multă muncă și imaginație pentru a realiza proiectul. D-l Profesor a stabilit câteva puncte de plecare, idei despre modul în care puteam să abordez subiectul. Am pornit la drum cu încredere și nerăbdare la ideea «minunilor» pe care urma să le descopăr.

Pentru mine ca și pentru mulți dintre noi, Institutul a început să devină un mod de viață. Ne-am maturizat o dată cu Institutul și am contribuit la evoluția Institutului.

Primii paşi ai unui cercetător – seminariile științifice Trimestrial, fiecare dintre noi trebuie să prezinte un raport de cercetare în cadrul unui seminar științific. Raportul urmează să fie «validat» de colegi și, cel mai important lucru, de către D-l Profesor. Seminariile sunt adevărate lecții privind modul de prezentare a rezultatelor cercetărilor noastre. Toți ne străduim să le pregătim cât mai bine ca să putem face față întrebărilor colegilor și, bineînteles, ale D-lui Profesor. Întrebările D-lui Profesor le astepți cu neliniște. Ele te aduc la limita de cunoaștere la care ești și pe care trebuie să o depășești, te fac conștient de locul tău, în acel moment, în evoluția științei. La finalul fiecărei prezentări, D-l Profesor ține o lecție de biologie celulară în care integrează rezultatele prezentate și evidențiază posibile dezvoltări ale proiectului. Definește drumul pe care trebuie să mergem în continuare și ne arată perspectivele pe care, fiind la început de drum, noi nu le întrevedem.

Sugerează fiecăruia cum să continue proiectul şi ce mai trebuie completat pentru ca în final să se poată realiza o lucrare ştiinţifică valoroasă.

Pentru unii dintre noi seminariile se termină în lacrimi sau revoltă atunci când nu putem să răspundem la câte o întrebare esenţială pentru tema prezentată, întrebare care verifică în detaliu cunoaşterea « obiectului de studiu ». Indiferent de reacţie, în final fiecare realizează că D-l Profesor are dreptate.

Maturitatea unui cercetător – lucrările ştiinţifice

Orice material ştiinţific trece pe la D-l Profesor. Este analizat «la sânge» şi noi aşteptăm rezultatul cu nerăbdare. Profesorul impune anumite standarde care treptat devin obişnuinţă. Ne obliga continuu să ne documentăm cât mai mult, să ne «gândim» experimentele cât mai profund, să le înţelegem cât mai bine, să lucrăm cât mai corect, să fim cât mai oneşti în interpretarea rezultatelor, să fim decenţi în prezentarea concluziilor lucrărilor noastre, să integrăm rezultatele în teorii generale şi să continuăm drumul pe căile cele mai potrivite.

Lecţiile D-lui Profesor sunt aprofundate cu fiecare «eveniment» trăit de noi în Institut: discuţiile despre temele de cercetare şi lucrările ce urmau să fie publicate sau prezentate, rapoartele de cercetare trimestriale, examenele, sesiunile ştiinţifice naţionale şi internaţionale. Cu timpul, pregătirea noastră ştiinţifică ne-a ajutat să fim mai aproape de statutul unui cercetător de valoare, aşa cum
Dl Profesor ne dorea să fim.

Gândindu-mă la « Lecţiile D-lui Profesor» înţeleg mai bine ceea ce spunea Albert Einstein : « Lucrul cel mai minunat cu care ne putem întâlni este misterul. La baza artei şi ştiinţei adevărate se află emoţia primară. Cel care nu ştie acest lucru şi nu mai poate fi curios sau simţi uimire este ca şi mort, asemenea unei lumânări stinse ». Realizez că aceste cuvinte exprimă foarte bine ceea ce gândea şi încerca să ne transmită şi nouă D-l Profesor, care, cu toată forţa personalităţii sale a reuşit să ne facă să existăm în ştiinţă şi în viaţă asemeni unor lumânari aprinse, uimiţi şi curioşi la « minunile lumii în care trăim », dornici să-i descifrăm misterele cu mintea şi sufletul. A făcut acest lucru demonstrându-ne prin propriul exemplu că se poate, mobilizându-ne cu o tinereţe şi o energie inepuizabile să ne depăşim limitele, să aspirăm către mai mult şi mai bine, să încercăm să ne apropiem de standardele înalte pe care le impunea D-l Profesor.

După trecerea in nefiinţă a D-lui Profesor, Institutul de Biologie şi Patologie Celulară a devenit Institutul de Biologie şi Patologie Celulară « Nicolae Simionescu ». Acum Institutul este condus cu succes de cea care i-a fost mereu alături în ştiinţă şi în viaţă, D-na Maya Simionescu. Sub coordonarea Dnei Maya am fost selectaţi, prin competiţie, Centru de Excelenţă al Comunităţii Europene. Continuăm drumul în spiritul a ceea ce deseori spunea D-l Profesor :

« Nu se poate construi nimic durabil, dacă în materialul de construcţie nu este adăugat « quatum satis », suflet. Fără dăruire nu poţi deveni niciodată ceea ce admiri ».

În anul 2005, IBPC-NS a câștigat prin competiție un grant important de la Comunitatea Europeana: PROIECTUL SERA

2005 – 2008

Titlul proiectului: Consolidarea Spaţiului european de cercetare prin consolidarea competenţelor de cercetare din România în genomică și proteomică a principalelor boli globale de risc: Ateroscleroza, diabetul și complicaţiile acestuia

Ziua de început: 1 mai 2005;

Durată: 36 luni Coordonator proiect: Dr. Maya Simionescu

Conceptul fundamental:

Să susţinem consolidarea cercetării noastre biomedicale (axate pe boli cardiovasculare, diabet și obezitate), să integrăm, să confirmăm și să evaluăm rezultatele noastre cu cele ale grupurilor de cercetare europene, să întărim colaborările cu cercetătorii din România, și statele membre UE și, astfel, să amplificăm contribuţia ştiinţei româneşti la ERA.

Obiectivele principale:

Să susţină și să îmbunătăţească activitatea de cercetare a Centrului de excelenţă IBPC NS al CE.

Să fie un participant activ la dezvoltarea cercetării la nivel naţional și regional.

Atragerea studenţilor la către o carieră ştiinţifică ce le oferă oportunităţi de educaţie în spiritul european.

Să consolideze colaborările în curs și să creeze condiţiile pentru noi cooperări cu centrele europene de cercetare.

Accelerarea transferului de cunoștinţe între cercetarea de bază și cea clinică în beneficiul medicinii moderne.

2007

recent advances in cardio-diabetology

BUCHAREST september 8. 2007

PROIECTUL EUROPEAN SERA

the international workshop
BUCHAREST march 2- 4. 2007

NICOLAE S
SOCIETATEA NATIONALA

Circulation
JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION
European Perspectives in Cardiology

Pioneer in Cardiology: Maya Simionescu, PhD

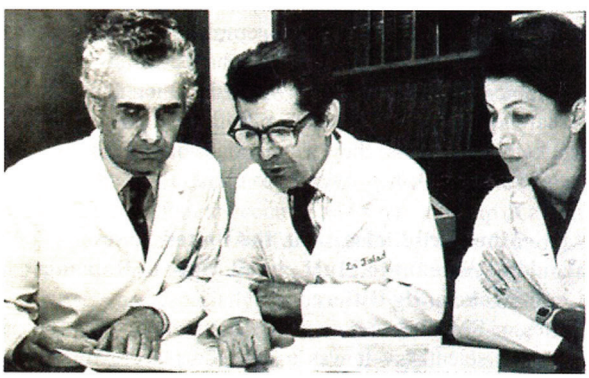
Realising a Dream to Establish Topflight Cardiovascular Research in Romania

Professor Maya Simionescu, director of the Institute of Cellular Biology and Pathology Nicolae Simionescu, Bucharest, Romania, tells Barry Shurlock, MA, PhD, about the pioneering research she did with her late husband Nicolae Simionescu, MD, and the challenges they faced in setting up the Institute, which is now a European Union "Centre of Excellence."

Imagine you are playing a computer game with the following scenario: you play the role of a young talented biomedical researcher from a small European country with an oppressive regime that cares not a whit about science. A chance meeting has given you (and your husband) the opportunity to work in the laboratory of a soon-to-be Nobel Prize winner on a major US university campus that has every facility—both personal and professional—that you could ever wish for. Your research thrives. You love all that America offers. You watch your homeland suffer political indignities that elsewhere would foment a revolution (and eventually do). Your work gets presented at major meetings, you get known, and soon the offers start rolling in—rewarding offers—Yale, McGill, University of Texas, etc. What do you do?

Maya Simionescu, PhD, director of the Institute of Cellular Biology and Pathology (ICBP) Nicolae Simionescu, Bucharest, Romania, faced this exact choice in 1970 when she went with her late husband and senior collaborator, Nicolae Simionescu, MD, to work with George E. Palade, MD, at Rockefeller University, New York, NY. (In 1974, Professor Palade shared the Nobel Prize for Medicine with 2 others [Albert Claude, MD, professor at the Rockefeller University, New York, NY, United States, and professor at the Université Catholique de Louvain, Louvain, Belgium, and Christian de Duve, MD, PhD, Rockefeller University] for work on "the structural and functional organisation of the cell"; he has since retired [age 96] from his final position as dean of science at the University of California–San Diego, San Diego, Calif.)

The Simionescus received the invitation to work in the United States at a time when the communist regime of Romania, under President Nicolae Ceauşescu, was trying to distance itself from the Soviet Union and to open dialogue with the West. Professor Simionescu recalls the time: "It



Professor Maya Simionescu (right) and Professor Nicolae Simionescu (left) with Professor George E. Palade in 1975. Photo courtesy of Professor Maya Simionescu.

On other pages...

Spotlight: Jeroen Bax, MD, PhD
Professor Bax, director of noninvasive cardiovascular imaging at Leiden University Medical Centre, Leiden, the Netherlands, is serving as chair of the European Society of Cardiology Congress Programme Committee 2007–2008 and is the man behind this year's cardiovascular imaging theme.
Page f41

IBPC - NS
2009 - 2019

SIMPOZION ANIVERSAR "IBPC - 30 DE ANI PE DRUMUL DE LA BIOLOGIA CELULARA LA MEDICINA MOLECULARA" 2009

Participants -
Friends of ICBP - NS

Prof. **Sam Silverstein**,
Columbia Univ. NY, USA
Prof. **Jim Jamieson**,
Yale University,
Prof. **John Bergeron**,
Canada- Mc Gill Univ, ,
Prof. **Shlomo Sasson** ,
The Hebrew University of Jerusalem, Israel
Prof. **Nadir Askenasy**,
Schneider Children's Medical Center of Israel,
Prof. **Werner Franke,**
German Cancer Research Center,
Prof. **Juergen Eckel**,
German Diabetes Center,
Prof. **Markus Khalil**,
University of Cologne, Germany,
Prof. **Kyriakos Kypreos**,
University of Patras Medical School, Greece,

30

INSTITUTUL de BIOLOGIE și PATOLOGIE CELULARĂ "NICOLAE SIMIONESCU"

ROMANIAN ACADEMY

INSTITUTE OF CELLULAR BIOLOGY AND PATHOLOGY "NICOLAE SIMIONESCU"

ICBP 30 YEARS

ON ROUTE FROM CELL BIOLOGY TO MOLECULAR MEDICINE

PROGRAM & ABSTRACTS

10-12 SEPTEMBER 2009

Felicia Antohe
Nadir Askenasy
John Bergeron
Gabriela Bălăz
Sanda Burlacu
Cosmin Buzila
Manuela Calin
Andrei Constantinescu
Madalina Dumitrescu
Juergen Eckel
Werner W. Franke
Zorina S. Galis
Ana-Maria Gan
Leonida Gherasim
Ionel Haiduc
Raluca Haraba
Constantina Heltianu
Cristina Iftode
Luminita Ivan
James D. Jamieson
Markus Khalil
Kyriakos Kypreos
Cristina Lupu
Florea Lupu
Marilena Lupu
Ileana Manduteanu
Adrian Manea
Simona-Adriana Manea
Horia Maniu
Ciprian Neagoe
Loredan Niculescu
Monica Madalina Pirvulescu
Doina Popov
Monica Raicu
Ana-Maria Rosca
Florentina Safciuc
Shlomo Sasson
Samuel S. Silverstein
Anca Sima
Maya Simionescu
Daniela Stan
Viorel Suica
Irina Titorencu
Violeta Trusca
Elena Uyy

2009

2009 -Simpozion aniversar “30 de ani pe drumul de la biologia celulară la medicina moleculară” Fosti/Actuali colaboratori și Prieteni IBPC-NS din țară/străinatate

2009 - Moment folcloric

IBPC - NS
2009 - 2012

2009 – 2012
Investiție
CARDIOPRO
Grant câștigat prin competiție din Fonduri Structurale

Extinderea și modernizarea infrastructurii de cercetare în vederea creșterii competitivității în domeniul bolilor cardiovasculare diabet și obezitate

finantat prin

PROGRAMUL OPERAȚIONAL SECTORIAL CREȘTEREA COMPETITIVITĂȚII ECONOMICE
AXA PRIORITARĂ 2 - CD & I: Operațiunea 2.2.1
„Investiții pentru viitorul dumneavoastră”

Director Proiect: Acad. Maya Simionescu

Durata proiect: 44 luni (martie 2009 – octombrie 2012)

Contribuţia UE: 33.629.687 Lei

Contribuţia Guvernului României: 20.370.046 Lei

Valoare proiect: 53.999.733 Lei

Proiectul pe scurt: reîntinerirea IBPC-NS – modernizare – noi laboratoare – aparatură de ultimă generație – standarde noi – Stiința mai bună -- o nouă imagine în Europa/în lume

....INCEPEREA LUCRARILOR ...

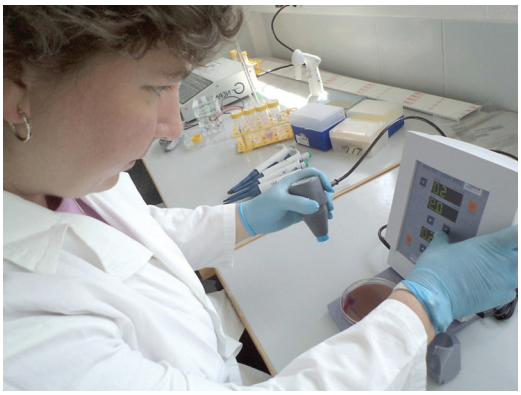
Pentru multe luni Aula se transformă în depozit

Toată activitatea de cercetare se restrânge în subsolul clădirii
Dar treaba merge mai departe!

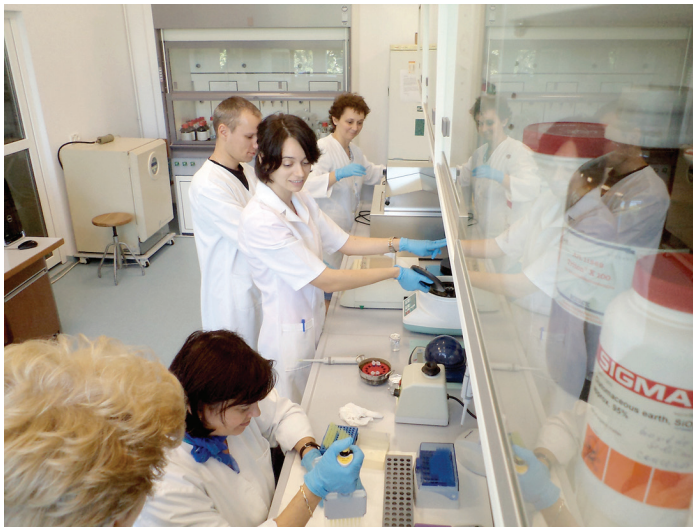
2009

PROIECTUL CARDIOPRO 2009-2012

CLINICA DE RE-INTINERIRE
noi departamente / laboratoare
noi echipamente
noi teme de cercetare

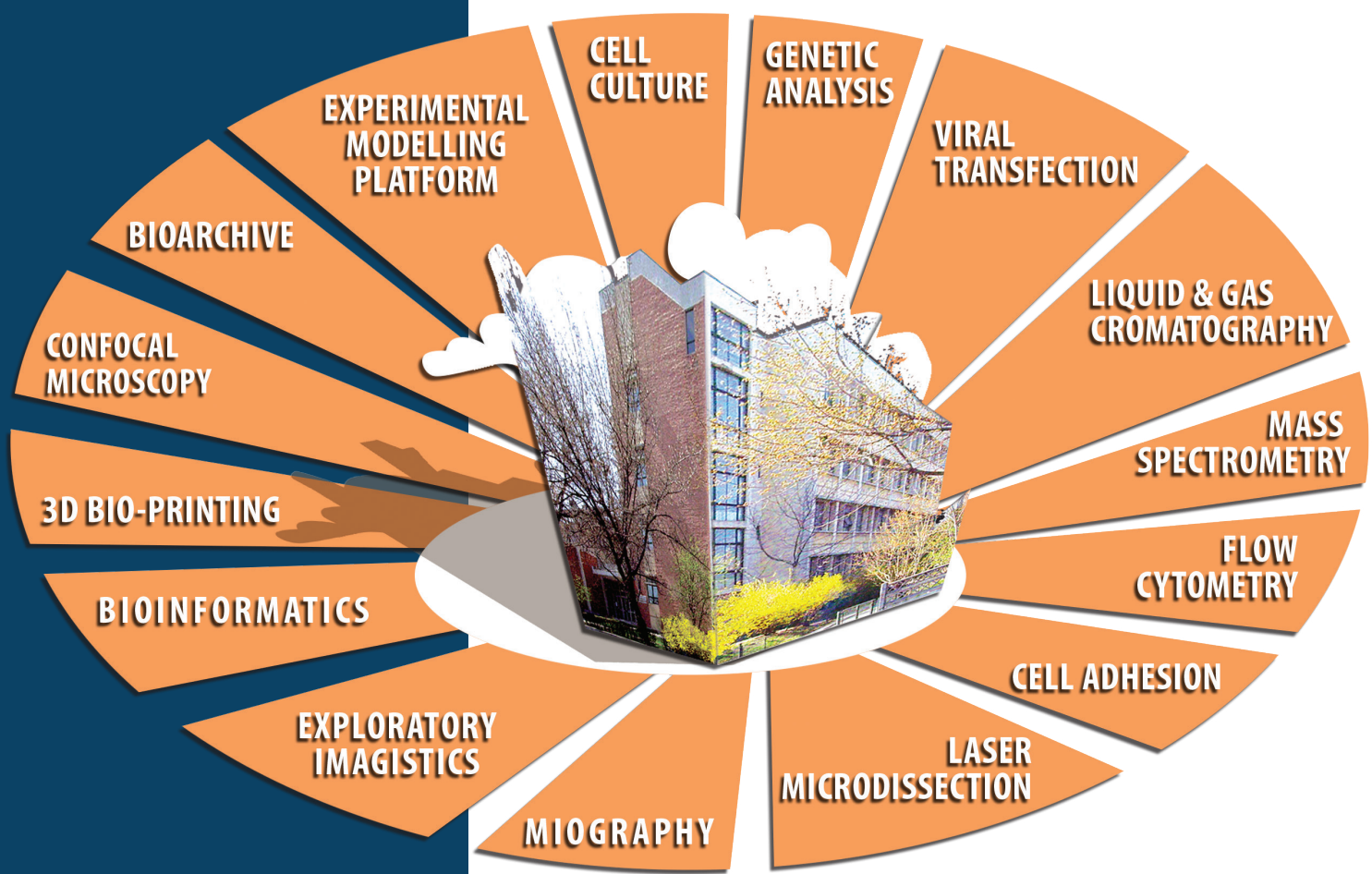


....am intrat în noile laboratoare ...
Aveam o “casă ca afară”



REORGANIZAREA
IBPC-NS:

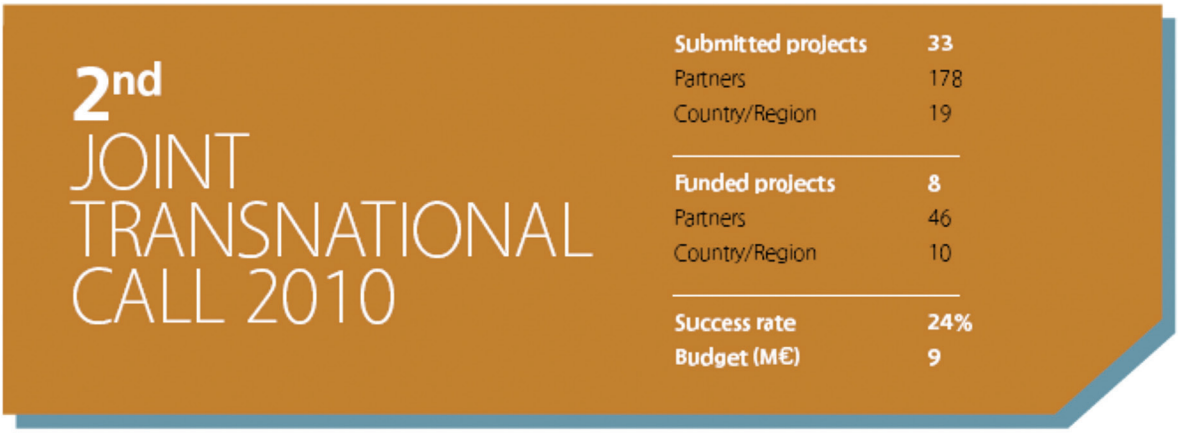
Noi Laboratoare de înaltă tehnologie au fost inființate prin proiectul CARDIOPRO - facilități comune -



PROIECTE EUROPENE CASTIGATE IN PERIOADA CARDIOPRO

NANODIATER

Nanoparticles designed to target chemokine-related Inflammatory processes in vascular diseases and cancer metastasis.



ROMÂNIA – GERMANIA – ELVEȚIA – TURCIA Director de proiect: M Simionescu
Coordonator echipa IBPC : Manuela Călin

RAMSES

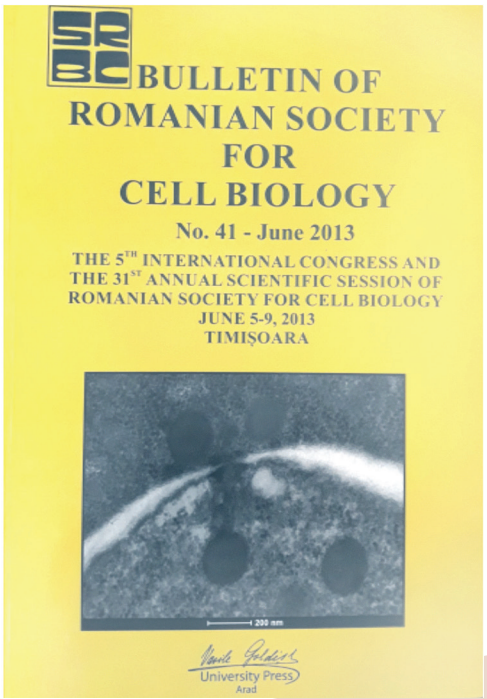
Reinforcement of the **A**dult stem cell research area through **M**obility and **S**cientific networking between **E**gypt, Romania and Germany for **S**trengthening the international scientific competency

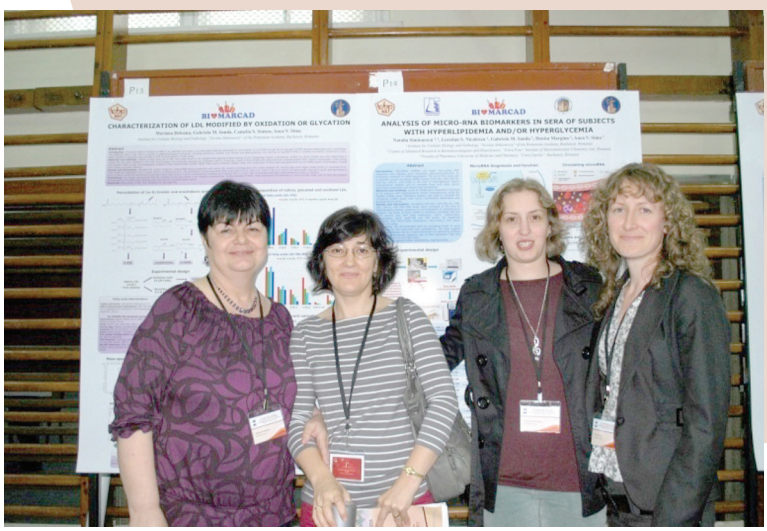
Participanti:
University of Cologne, Cologne, Germany / ICBP „Nicolae Simionescu“, Bucharest, Romania
Cairo University, Cairo, Egypt.
Funding source:
EU FP7, Capacities-International Cooperation

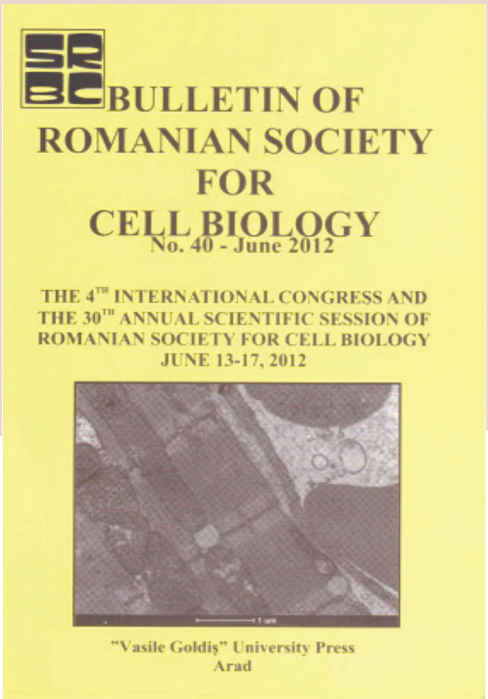
2012

A 33-a SESIUNE STIINTIFICA ANUALA IBPC-NS

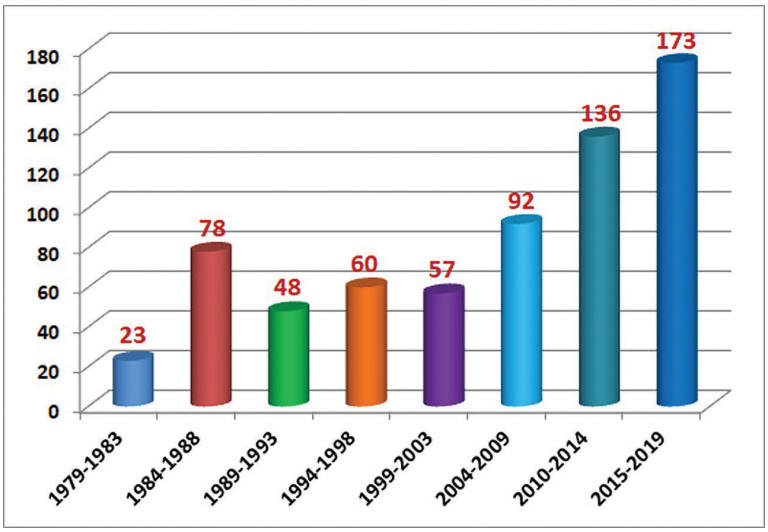
SRBC își continuă activitatea – simpozioane internaționale anuale în diverse centre Universitare

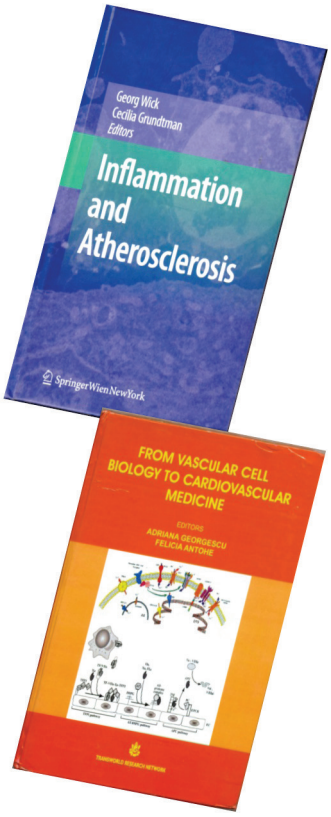






PUBLICAȚII: 1979 – 2019
reviste internaționale 12390 citari (ISI)





Președintele României

Dorind a răsplăti meritele Institutului de Biologie și Patologie Celulară al Academiei Române,

cu ocazia împlinirii a 25 de ani de la înființare, în semn de apreciere a deosebitei activități de cercetare bio-medicală, care a determinat desemnarea sa ca Centru de Excelență al Comunității Europene,

Conferă Ordinul „Meritul Cultural" categoria 4 „Cercetare științifică"

în gradul de Ofițer

Dat în București la 7-IX-2004

Președintele României

Ion Iliescu

Cancelarul Ordinelor

Ministrul Culturii și Cultelor

Decret nr. 666 Din 7-IX-2004 Nr. crt. 77110

Brevet MC/ nr. Of. I

1979-2014

Premii acordate cercetătorilor din IBPC

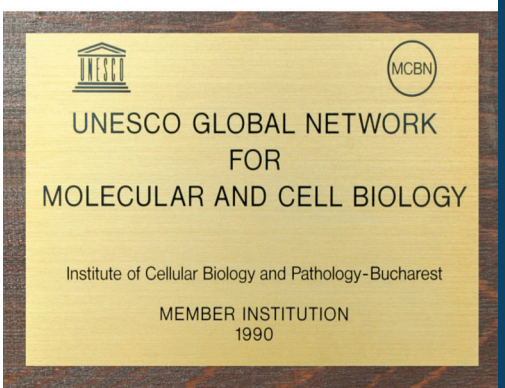
Centru de Excelență al Academie Române și al Ministerului Educației și Cercetării

2004 - Distincția "Meritul Cultural " în grad de Ofițer, conferită de Președinția României, cu prilejul celei de-a 25-a Aniversări

"Conceived în România" Diploma de Excelență a Ministerului Educației și Cercetării

30 Premii Internaționale

50 Premii Naționale

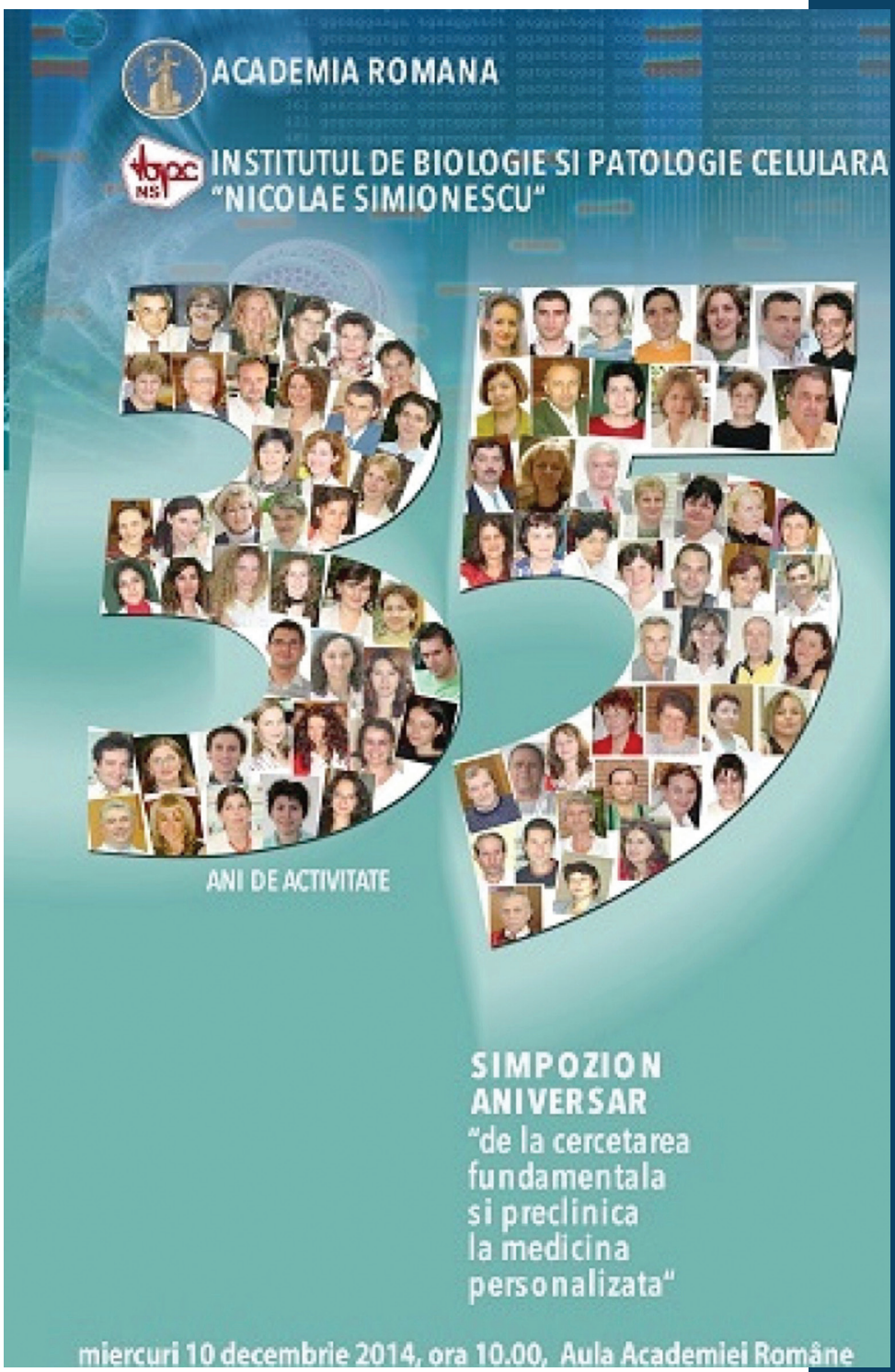


3 OCTOMBRIE
2013

Acad. Maya Simionescu primește distincția de Cavaler al Ordinului Național “Legiunea de Onoare” a Franței în cadrul unei ceremonii organizate la Ambasada Franței

2014

Aniversare IB-PC-NS la 35 de ani de activitate



2014
IBPC-NS la a 35-a aniversare

2014 Interviu dat de Maya Simionescu la Jurnalul Național "Din dragoste pentru patria numită Știință"

Acad. Maya Simionescu

A venit pe lume într-o zi de Dragobete. Puțină lume stă să se gândească la asta, atunci când vorbește cu Maya Simionescu, academicianul, omul de știință, femeia care a lucrat, cot la cot, frunte lângă frunte, gând inspirat lângă gând inspirat, în același laborator cu unul dintre puținii români cu un premiu Nobel în palmares (și l-am numit pe George Emil Palade). Puțină lume observă ca dragostea a fost semnul ei cel mai puternic și că într-un cuplu – unul dintre cele mai sudate din istoria științelor românești –ea, Maya Simionescu, și el, Nicolae Simionescu, au adus României poate cel mai puternic pilon în domeniul cercetării: Institutul de Biologie și Patologie Celulară din București.

In Bucureștiul răscolit de viscol, stăm de vorbă chiar acolo, "acasă, la Institut", despre jumătatea de secol și mai bine pe care au străbătut-o împreună. (Chiar și după ce profesorul Nicolae Simionescu s-a stins, n-a părăsit nici o secundă "corabia" pe care împreună au imaginat-o, au lansat-o, au condus-o prin vremi... fiind, încă, la 77 de ani, directorul prestigiosului edificiu al științei).

Admitem că una dintre dimensiunile interviului nostru să fie aceasta: "despre dragoste și patriotism". Se consideră "cetățean cu drepturi depline" în două țări. Una se numește România, cealaltă... Țara Științei. Institutul pe care îl conduce astăzi – și pe care l-a fondat, în urmă cu mai mult de patru decenii, împreună cu soțul ei, profesorul Nicolae Simionescu – a apărut pe lume tocmai datorită acestui atașament plenar pentru cele două "țări" de care s-a simțit pentru eternitate legată. Și aici se cuvine să intrăm puțin în poveste. În acea poveste care, atunci, în anii 70, părea de neînțeles pentru multă, multă lume, dar care privită astăzi, prin prisma dragostei și a patriotismului, este pe deplin justificată...

"Cred că eram determinați genetic să facem ceva în România"

"Când Nicolae Simionescu și cu mine am gândit și am hotărât să facem asta, urmăriți fiind de ideea de a înființa un institut de cercetare în România, eram de câteva luni de zile în America, la invitația profesorului George Emil Palade, care ne-a selectat dintre toți cercetătorii pe care i-a văzut când a venit în România. Când noi am văzut cum se face cercetarea adevărată, care este atmosfera, cum este posibil ca tinerii să poată să-și dovedească inteligența, fantezia, am hotarât să facem acest institut la București. Nu pentru regim – că nu aveam nimic cu regimul, nu pentru că nu aveam unde să lucrăm – pentru că am primit în acel timp niște oferte minunate din America, deci puteam să ramânem acolo și să ne îndeplinim toate visurile științifice. Am vrut să facem acest institut la București pentru că doream ca tinerii noștri, care sunt foarte talentați, să nu mai treacă prin ce am trecut noi, în cei 10-20 de ani de greutăți. Știam că se poate face cercetare de calitate în România. Consideram că dacă am avut șansa – pentru care am muncit mult de tot – de a munci în America atât de bine, trebuia să dăm înapoi societății. Și să-i dăm Americii încă doi cercetători în biologie celulară nu știu dacă era foarte interesant. America avea o armată minunată de cercetători. Atunci ne-am zis că cel mai minunat lucru era dacă puteam să aducem cercetarea în România".

Puțini au înțeles, la vremea aceea, de ce doi iluștri cercetători, care avuseseră și șansa de a lucra alături de geniul aureolat de Premiul Nobel, profesorul George Emil Palade, au ales să se întoarcă în România. Pentru visul lor – asupra cărora nu oboseau să vorbească, însuși profesorul a considerat că trebuie să se implice, trimițând lungi scrisori de sprijin în țară. Era, aparent, împotriva logicii. Dar avea să se dovedească un pas important, un pas necesar, care nu lua seama la

nici un regim politic. ”Anii 1970-1971 nu erau totuși foarte răi, în România. Ne hotărâsem să dezvoltăm biologia celulară, pentru că ne-am dat seama că așa puteam impulsiona și dezvoltarea altor domenii ale cercetării științifice. Departe de a da ceva lui Ceaușescu, noi voiam să dăm ceva României și... Țării Științei. Șansa noastră a fost că existau niște oameni, în funcții importante, cum era profesorul Dorel Burghele, care ne-au ajutat extraordinar. El era interfața cu politichia din România. Ideea pe care o promova era ”Dacă ați găsi doi români care să se întoarcă în România după 10 ani în America, dacă tot i-ați găsit, profitați!”. Sigur că eram împotriva curentului, toată lumea nu mai știa cum să plece. Și noi...ce am avut?

...Nu știu. Cred că eram determinați genetic să facem ceva în România.”

A fost o luptă colosală pentru obținerea aprobărilor, a fondurilor necesare. O luptă în care s-au implicat persoane diferite, profesori, oameni politici, ambasadori... În 1979, institutul a fost deschis. ”L-am deschis în septembrie '79 și în '80 ne-au tăiat toate fondurile, în afară de salarii. Au zis : treaba lor, să facă ei ce vor. Salvarea noastră a fost tot America, institutul național de sănătate. Am început să concurăm pentru accesarea de fonduri. Altfel... închideam a doua zi institutul.”

”Republica nu are nevoie de savanți, dar noi trebuie să mergem înainte!”

Remarcă faptul că, indiferent de regim, de epocă, politicienii nu prea înțeleg rostul investițiilor în știință. Excepție fac acele domenii al căror rezultat e vizibil imediat și care, prin natura lucrurilor, pot și să întoarcă imediat beneficii. Dar domeniile acelea nu ar exista fără celelalte, fără cercetarea pură, nealterată. Citează un fragment dintr-un discurs al lui Nicolae Simionescu, la un simpozion științific din anii '80 : ”Republica nu are nevoie de savanți, dar noi trebuie să mergem înainte!”. (Sigur, din povestea asta este exclusă o anume... ”savantă” de tristă amintire). ”Acum, privind înapoi, îmi dau seama că institutul, în 1990, era deja bine cunoscut în Europa. Nu e ușor ca un institut care apare așa, dintr-odata, în Țara Științei, să își facă drum și să reușească, în 12 ani, să devină un partener viabil. Mai mult, în anul 2000 a fost selecționat ca membru al rețelei UNESCO MCBN (Molecular cell-biology network).”

Dialogul a curs îndelung (se impune o publicare a interviului, in extenso). Insă acum și aici trebuie menționate câteva idei. Despre mentori : ”Pentru mine, George Emil Palade și Nicolae Simionescu sunt mentorii, modelele mele. Nu am copiat nimic de la ei, dar am luat ce mi s-a potrivit și am ajustat după mine. Da, sigur, am învățat mult de la ei, iar influența lor este inestimabilă”. A fi femeie, în Țara Științei : ”Nu e un avantaj. Femeile, cu toate că au talent în cercetare, trebuie să muncească mai mult ca să se evidențieze. Istoria științei a arătat că nu întotdeauna femeile au fost cele mai apreciate. Din 210 Premii Nobel care s-au luat de când a fost întemeiată distincția, 10 au fost obținute de femei”.

Un nou proiect câştigat pentru modernizarea Institutului coordonator Dr. Horia Maniu

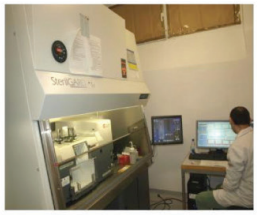
2014

SORTIS

STRUCTURAREA UNUI COMPARTIMENT NOU DE SORTARE CELULARA SI CRIOCONSERVARE TISULARA PENTRU CERCETARE SI IN SCOP TERAPEUTIC

PRINCIPALELE APARATE SI UTILAJE ACHIZITIONATE

- ⇒ **SORTER CELLULAR**
- ⇒ **PLATFORMA MICROARRAY**
- ⇒ **BIOIMPRIMANTA 3 D**
- ⇒ **INSTALATIE DE PRODUCERE AZOT LICHID**
- ⇒ **ELECTROPALAN**
- ⇒ **APARATURA DE LABORATOR**



SORTERUL CELULAR

MoFlo Astrios EQ - capacitate de analiza mai larga, flexibilitate a aplicatiilor, usor de folosit, intuitiv si flexibil.

Domenii de utilizare

- ⇒ Markeri de adeziune, Apoptoză
- ⇒ Celule B, Semnalizare celulară
- ⇒ Celule dendritice, Patologii hematologice
- ⇒ Monitorizare imună, Inflamaţie
- ⇒ Monocite/ Macrofage
- ⇒ Celule NK/ NKT, Celule stem, Celule T

http://

BIOIMPRIMANTA 3 D

Aparatul **3DDiscovery®** este o platforma de bioimprimare 3D folosita in ingineria tisulara.

Modele tisulare 3D de studiat si identificat

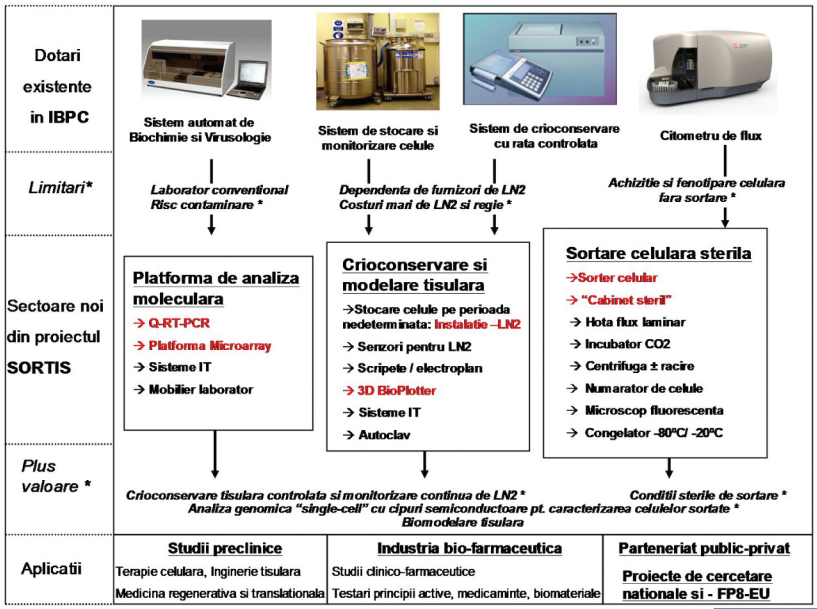
- Interactiuni celula-celula
- Metabolizarea medicamentelor
- Relevanta *in vivo*
- Diferentierea

SORTIS

STRUCTURAREA UNUI COMPARTIMENT NOU DE SORTARE CELULARA SI CRIOCONSERVARE TISULARA PENTRU CERCETARE SI IN SCOP TERAPEUTIC

Descrierea componentelor şi valoarea aplicativă a proiectului "SORTIS"

Proiectul SORTIS - 2014-2015



In Memoriam

Prof. Nicolae Simionescu
1926 - 2015

ACADEMIA ROMÂNĂ

INSTITUTUL DE BIOLOGIE SI PATOLOGIE CELULARA
"NICOLAE SIMIONESCU"

Sesiune omagială

In Memoriam

Prof. Nicolae Simionescu

27 Iunie 1926 – 6 Februarie 1995

BUCUREŞTI
Vineri, 6 februarie 2015

PROGRAM

10.30 - 12.00 Alocuţiuni

Acad. MAYA SIMIONESCU

Dr. ILEANA MÂNDUŢEANU
Membru al Academiei de Ştiinţe Medicale

Prof. LEONIDA GHERASIM
Membru de onoare al Academiei Române

Prof. RADU DEAC
Vicepreşedinte al Academiei de Ştiinţe Medicale

Dr. DOINA VELICAN
Membru al Academiei de Ştiinţe Medicale

Dr. ANCA SIMA
Membru corespondent al Academiei Române

Prof. MIHAI COCULESCU
Membru corespondent al Academiei Române

Acad. DOINA POPOV

12.00 - 12.15 Proiecţia filmului

"UN SECOL DIN NEMURIRE"

CUVANTUL PROFESORULUI NICOLAE SIMIONESCU rostit in 1989 cu prilejul comemorării în institutul nostru a CENTENARULUI MIHAI EMINESCU

12.15 - 12.30 Pauză

PREZENTĂRI ŞTIINŢIFICE

ale Doctoranzilor şi Post-Doctoranzilor din IBPC-NS

12.30 - 13.30

Dr. Gabriela Sanda
LDL oxidat induce secreţia de CRP şi MMP-9 în macrofagele umane; efectul protector al extractului de afine

Dr. Raluca Boteanu
Alarmina HMGB1 menţine procesul inflamator în plămânul diabetic

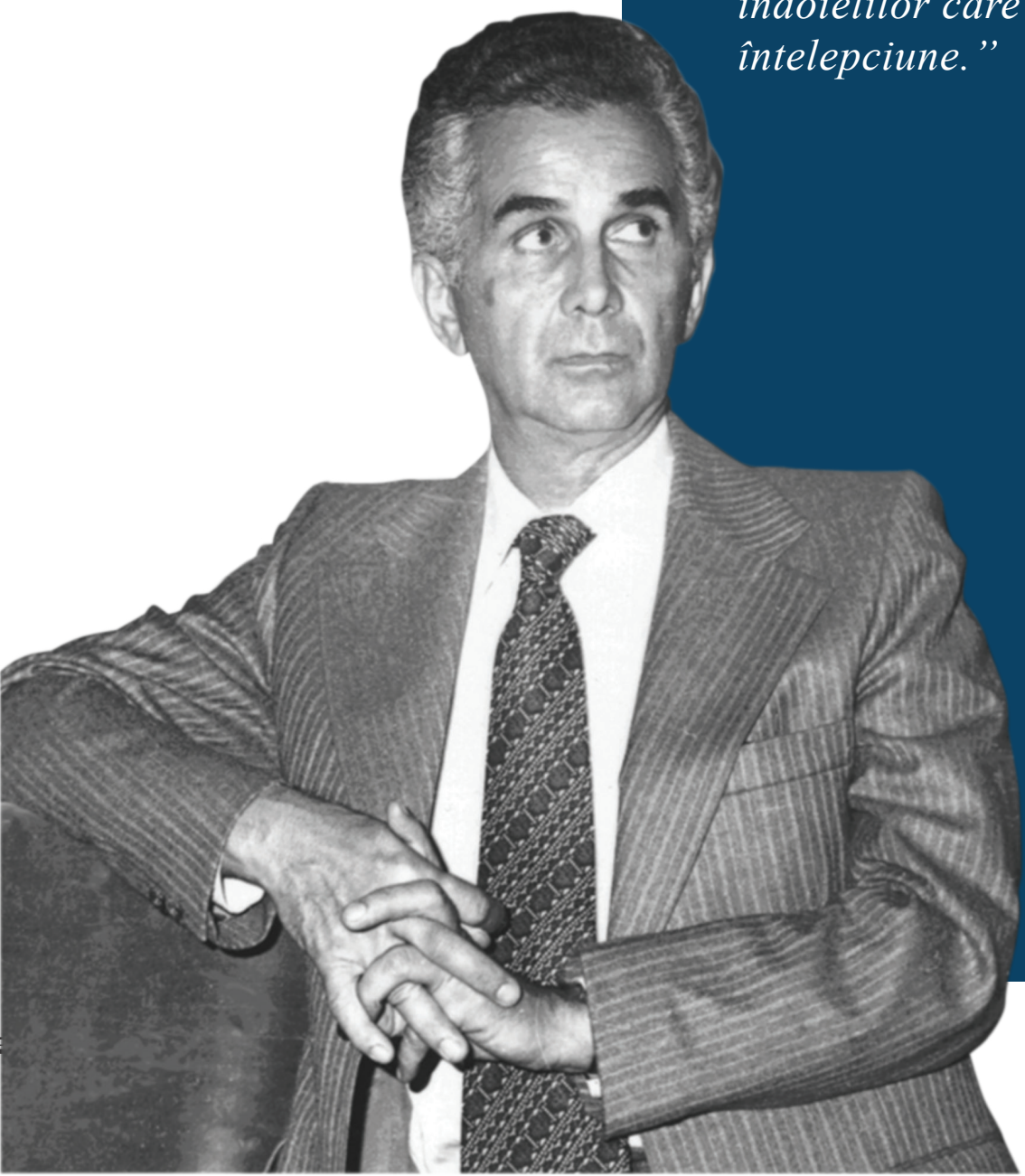
Dr. Bogdan Preda
Angiogeneza indusă de celulele stem transplantate subcutan reduce hipoxia în agregatul celular in vivo

Drd. Monica Pârvulescu
Rezistina subendotelială creşte transmigrarea monocitelor; mecanisme implicate

Drd. Mirel Popa
Stimularea cu hormoni estrogeni amplifică integrarea celulelor stem în miocardul ischemic

UN MODEL DE VIATA, O VIATA DE VISE SI IDEI IMPLINITE

”Cercetatarea științifică este mai mult decât o profesie, este un mod de a trăi, cu strădanii reușite alături de încercări nereușite, iar între ele marea agitată a îndoielilor care te invită la înțelepciune.”



”Nu se poate construi nimic durabil, dacă în materialul de construcție nu este adăugat “quantum satis” – suflet. Fără dăruire nu poți deveni niciodată ceea ce admiri.”

2017

SIMPOZION ANIVERSAR

“UNIVERSUL DIN CELULĂ”

2017-Simpozion Aniversar cu ocazia zilei de naştere a Dnei Acad. Maya Simionescu "Universul din Celulă"

ACADEMIA ROMANĂ

INSTITUTUL DE BIOLOGIE ŞI PATOLOGIE CELULARĂ
"NICOLAE SIMIONESCU"

Cu ocazia aniversării
zilei de naştere a Doamnei Academician

Maya Simionescu

Vă invită să participaţi la

Simpozionul Aniversar
UNIVERSUL din CELULĂ

Joi, 23 Februarie 2017,
orele 10 - 14
Aula Academiei Române
CaleaVictoriei nr.125

Vineri, 24 Februarie 2017,
orele 14:30- 18:30
Institutul de Biologie şi Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"
Amfiteatrul G. E. Palade
Strada B.P. Haşdeu nr. 8

Thierry de Montbrial

Fondator și Președinte IFRI, membru al Academiei de Științe Morale și Politice din Franța și membru de onoare al al Academiei Române.

În ajunul aniversării de optzeci de ani, Maya Simionescu continuă sa strălucească și să proiecteze o imagine a tinereții. Aceasta nu numai datorita avantajelor pe care i le-a conferit generoasa natură. Maya este o femeie superbă, nu numai prin frumusețea fizică, dar de asemenea, și mai ales prin frumusețea interioară. Am fost întotdeauna convins, ca și Cicero, că de la o anumită vârstă, avem chipul a ceea ce suntem. Cercetător eminent, cu lucrări care o situeaza la cel mai înalt nivel internațional, ea s-a dovedit, de-a lungul carierei sale, mai ales când a trebuit să preia succesiunea de la soțul ei, un organizator remarcabil. A conduce cu succes o instituție de cercetari stiintifice necesită o combinație rară de talent științific, managerial, diplomatic. Trebuie să se unească în același caracter spiritul geometric și spiritul de finețe, fermitatea și flexibilitatea. E nevoie de o determinare neclintită combinată cu o mare capacitate de adaptare. Maya Simionescu a continuat să exceleze în exercitarea responsabilităților sale, iar farmecul său unic a lucrat întotdeauna în beneficiul celor care au avut sansa de a se afla în sfera ei de influența. Situându-se întotdeauna în frunte prin meritele sale, ea a știut să reziste vanității și corupției eului, așa cum am constatat-o însumi timp de cincisprezece ani în cadrul seminarului Penser l'Europe, de la începutul mileniului însufletit de ea cu academicianul Eugen Simion și grupul de intelectuali europeni care îi înconjoară. Există în acest "club de la Bucuresti" o intenție umanistă care constituie combustibilul. Dar flacăra nu ar continua să ne lumineze fără Maya, mereu prezentă, eficientă, imaginativă, optimistă și orientată spre viitor. Fie ca tinerețea ei să ne dea energie mulți ani înainte.

A l'approche de son quatre-vingtième anniversaire, Maya Simionescu continue de rayonner et de projeter l'image de la jeunesse. Ce n'est pas seulement en raison des atouts que la généreuse nature lui a conférés. Maya est une femme magnifique, non seulement par la beauté physique, mais aussi est sans doute surtout par la beauté intérieure. J'ai d'ailleurs toujours été convaincu, comme Cicéron, qu'à partir d'un certain âge, on a le visage de ce que l'on est. Chercheuse éminente, avec des travaux qui la situent au plus haut niveau international, elle s'est aussi révélée tout au long de sa carrière, surtout quand elle a dû prendre la relève de son mari, une organisatrice hors pair. Diriger avec succès une institution de recherche suppose une rare combinaison de talents scientifiques, managériaux, diplomatiques. Il faut réunir dans un même caractère esprit de géométrie et esprit de finesse, fermeté et souplesse. Il faut une détermination sans faille associée à une grande capacité d'adaptation. Mais il faut aussi savoir interagir avec les pairs et plus généralement avec un environnement complexe, notamment pour le financement. Maya Simionescu n'a cessé d'exceller dans l'exercice de ses responsabilités et son charme exceptionnel a toujours opéré au bénéfice de ceux qui ont eu la chance de se trouver dans sa mouvance. Se situant toujours au premier rang par ses mérites, elle a cependant su résister à la vanité et à la corruption de l'ego, comme j'ai pu moi-même le constater depuis quinze ans dans le cadre du séminaire Penser l'Europe dont elle est l'âme, auprès de l'académicien Eugen Simion et du petit groupe d'intellectuels européens qui les entourent ainsi depuis le début du millénaire. Il y a, dans ce "club de Bucarest", une intention humaniste qui en constitue le carburant. Mais la flamme ne continuerait pas de nous éclairer sans Maya, toujours présente, efficace, imaginative, optimiste et tendue vers l'avenir. Puisse sa jeunesse continuer de nous dynamiser de longues années encore.

Î.P.S. Ioan Robu

membru de onoare al al Academiei Române.

Domnule Președinte, Domnilor Vicepreședinți, Doamna Academician Maya Simionescu, domnilor și doamnelor academicieni, stimați invitați. În general când privești o viață împlinită cu bucuriile și realizările ei ești tentat să te intrebi dacă nu cumva la temelia succesului a stat o formulă secretă pe care aflând-o să o poți recomanda și altora ori pe care să o pui tu însuți în practică, apoi respingi ideea formulei secrete ca pe o ispită zicându-ți că așa ceva nu există, căci istoria fiecărui om e alcătuită dintr-o mulțime de evenimente complexe care nu se pot reduce la un singur numitor și totuși privind la viața și cariera profesională a Doamnei Academician Maya Simionescu un fir roșu pare să se distingă încă de la început. Mi-am descoperit rezumat în această frază scurtă rostită cu câțiva ani în urmă într-un interviu pe când Doamna Academician povestea despre prietena ei de la 6 ani, o fetiță infirmă pe care căuta cu disperare să o învețe să meargă, spunea "Aveam răbdare și o iubeam foarte tare". Descria astfel atitudinea ei la vremea respectivă, o vreme dificilă în Bucureștii celui de al 2-lea război mondial, când din cauza bombardamentelor celor două fetițe erau silite să se izoleze cu părinții lor în adăposturile antiaerinene. Erau deci o iubire și o răbdare generată de această micuță prietenă, atunci la vârsta de șase ani, însă privind și mai departe la anii de studenție făcuți cu pasiune dar și cu dificultate din cauză că nu avea dosar bun.

Privind la începuturile carierei de cercetare cu minime mijloace materiale dar binecuvântate de o mare curiozitate științifică și până la dezvoltarea Institutului de Biologie și Patologie Celulară Nicolae Simionescu, privind deci la întreaga viață a Doamnei Academician observăm această constantă, răbdare și iubire, față de oameni, față de munca de cercetare, față de viitor. Poate că sună ciudat această exprimare, răbdare și iubire față de viitor, dar este una dintre componentele formulei secrete a succesului Doamnei Maya Simionescu. Tot ceea ce a primit de la Dumnezeu, fie că e vorba de atributele intelectuale proprii, de înclinația deosebită către cercetare, fie că e vorba de a lucra cu specialiști de talia profesorului George Emil Palade, Doamna Academician a cautat întotdeauna să construiască cu răbdare cu iubire și cu profesionalism pentru viitor. Așa se explică pe deoparte însăși alegerea Doamnei Simionescu de a se dedica cercetării într-un domeniu fundamental, sănătatea. Așa se explică și faptul că Institutul de Biologie și Patologie Celulară înființat de soții Nicolae și Maya Simionescu în 1979 a crescut constant de-a lungul celor aproape 40 de ani de activitate fiind un important stimulent în cercetarea națională și internațională. Tot așa se explică și faptul că institutul respectiv are un colectiv numeros cu o medie de vârstă foarte tânără și tot așa se explică căldura, pasiunea, energia cu care Doamna Academician continuă să se implice în truda zilei de azi cu tot ce presupune ea pentru un profesor, pentru un director de institut de cercetare care se luptă din răsputeri să țină aproape tinerele talente aici în țară pentru viitorul României

Doamna Academician Maya Simionescu, Dumnezeu să vă binecuvânteze și să vă binecuvânteze și pe voi toți, doamnelor și domnilor Academicieni și invitați. Dumnezeu, Stăpânul timpului și al istoriei să ducă la îndeplinire toate așteptările, năzuințele și speranțele voastre.

La mulți ani, Doamna Maya, la mulți ani tuturor.

Academician Valentin Vlad

Deschid această sesiune omagială dedicată Doamnei științei românești, Maya Simionescu și vă spun că particip cu mare bucurie și plăcere la această sărbătoare care este a dumneavoastră Doamnă Academician dar și a întregii Academie Române. Sărbătoare pe care francezii ar numi-o "Quatre Vents".

În scurta mea introducere voi enumera câteva considerente personale pentru această bucurie și onoare. În 1994, Domnul Vicepreședinte Academicianul Nicolae Simionescu ne-a ales pe Domnul Academician Florin Filip și pe mine ca primii vicepreședinți ai Consiliului de Granturi al Academiei Române, poziție în care am colaborat și cu Domnia Sa, cu regretatul Academician Nicolae Simionescu dar și cu Doamna Vicepreședinte a Academiei Române, Maya Simionescu timp de 8 ani, și a fost o colaborare excelentă aș spune, care era dedicată Academiei Române și ne aducem aminte în ce condiții, nu erau bani și aceste granturi aduceau o speranță dacă vreți și-o bucurie pentru cei care obțineau aceste granturi.

Am colaborat serios în evaluarea cercetării științifice din Academia Română, la elaborarea strategiei naționale și a Academiei Române, beneficiind de experiența mari Doamne a Științei din România și din lume care este Doamna Maya Simionescu. Am fost invitat și am participat cu plăcere și interes științific la un număr de sesiuni ale Institutului de Biologie și Patologie Celulară care după cuvintele fondatorilor este rezultatul unui vis. Și anume a luptei unor mari savanți, Nicolae Simionescu și Maya Simionescu pentru acest vis, a unei munci de cercetare științifică și de educație exemplară practicate la început în laboratoarele celui mai reputat savant romano-american, George Emil Palade, laureat Nobel în fiziologie medicină și acum a unei tradiții de instituție de cultură, citez pe regretatul Academician Nicolae Simionescu "Instituție de cultură în care se lucrează știință".

De aproape 25 de ani acest vis este dus înainte de distinsa Doamna Academician Maya Simionescu care-i crează un drum prestigios atât prin noi deschideri, de exemplu nanoștiințele cât și prin găsirea resurselor umane și materiale pentru cercetarea științifică fundamentală și aplicată în domenii de vârf în condițiile pe care le avem în țară de obicei de subfinanțare dacă nu aș spune o subfinanțare permanentă. Am avut ocazia să evidențiez de multe ori rezultate excelente ale Institutului de Biologie și Patologie Celulară Nicolae Simionescu dar îndrăznesc să fac în continuare o scurtă incursiune pe Google Scholar care este atât de accesibil, unde găsesc aproape 600 de lucrări la numele Maya Simionescu dintre care 20 sunt cu peste 100 de citări, o performanță care este să zicem de cele mai înalte premii internaționale. Primele sunt, nu o să dau tot titlul dar "Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium" publicată în Journal of Cell Biology în 1986 cu 344 de citări. A doua nu-i mai dau numele dar este tot publicată în Journal of Cell Biology în 1983, puțin înainte cu 318 citări. Poate pentru cineva niște numere de genul acesta nu spun mare lucru dar factorii de impact ai acestor reviste sunt mai mici față de numărul mediu anual de citări pe care le au. Deci aceste lucrări sunt printe cele care formează factorul de impact al revistei respective alături de cele mai importante lucrări rezultate din laboratoarele americane și cele care sunt cele mai bune în acest domeniu foarte înalt. În evaluările naționale și internaționale ale Institutului de Biologie și Patologie Celulară a fost și rămâne cum era scris în Nature în 1994 un giuvaier în coroana Academiei Române. Activitatea Doamnei Academicia ca Președinte a Secției de Științe Biologice în Prezidiul Academiei Române promovează

valorea ştiinţifică şi un fin şi benefic echilibru pe care-l admirăm în dezbaterile noastre. Sesiunea omagială de astăzi şi aceea ştiinţifică de mâine de la Institutul de Biologie şi Patologie Celulară sunt interesante atât pentru specialiştii în domeniu cât şi pentru nespecialişti prin tratarea unor probleme ştiinţifice de mare actualitate şi dificultate în bolile cardiovasculare de care suferă două treimi, doi din trei români, în diabet cu o creştere alarmantă, în strategiile terapeutice bazate pe nanotehnologii, terapia celulară şi altele. Toţi suntem vizaţi cu probabilităţi diferite şi costuri sociale mari deci rezultatele ştiinţifice aplicabile relativ rapid sunt benefice pentru societate. Sperăm că aceste rezultate ale Institutului de Biologie şi Patologie Celulară să fie clare şi pentru cei care decid finanţarea cercetării în ţara noastră. Aş mai adăuga o serie de lucruri care probabil ca este greu ca să le adauge sărbătoritul şi anume faptul că Doamna Academician în afară de aceste numere care de multe ori nespecialiştilor nu spun mare lucru, este apreciată în cele mai înalte societăţi academice, este membru European Life Science Ogranization, Vicepreşedinte European Cell Biology Organization, Membru al Academiei de Ştiinţe Medicale, membru de Onoare al Academiei de Ştiinţe a Republicii Moldova şi multe altele, Real Academia de Doctores, Universitatea din Barcelona, Doctor Honoris Causa al Universităţii Ovidius din Constanţa, a Universităţii de Medicină Gr. T. Popa din Iaşi, a Universităţii de Vest din Timişoara, a primit premiul internaţional Louis and Artur Lucian, nu ştiu dacă este român la origine, personalitatea respectivă, personalităţile respective cum ar trebui citite, Premiul Special Unesco L'Oreal pentru femei în ştiinţă şi a fost distinsă cu ordinul Rio Branco în grad de comandor acordat de preşedenţia Braziliei, cu Ordinul Naţional Serviciu Credincios în Grad de Mare Cruce, cu Ordinul Meritul Cultural în Grad de Ofiţer şi cu Ordinul Naţional Steaua României în Grad de Mare Ofiţer iar în 2013 i s-a acordat titlul de Cavaler al Ordinului Naţional Legiunea de Onoare a Franţei. Cu toate aceste gânduri şi aprecieri, cu toată admiraţia noastră pot să vă spun că vă urez din partea mea personal şi din partea conducerii Academiei ca excepţionala activitate pe care aţi desfăşurat-o să continue cu mari succese în ţară, în Uniunea Europeană şi în lume.

La mulţi ani cu multe realizări în continuare, Distinsă Doamnă a Ştiinţei Româneşti şi de pretutindeni, Doamna Academician Maya Simionescu.

Academician Victor Voicu

Vicepresedinte al Academiei Române

Intervenţia mea scurtă se intitulează "Omagiu pentru o distinsă colegă.", Academician Maya Simionescu. Am oarecare emoţii, este un mare privilegiu şi o reală satisfacţie pentru mine să fiu părtaş nemijlocit la sărbătorirea distinsei noastre colege Maya Simionescu, cu ocazia trecerii a încă un an din prestigioasa sa activitate. Se încheie o etapă dintr-un proces care continuă cu performanţe remarcabile, profesionale, ştiinţifice, organizatorice, de solidaritate şi căldură umană.

Maya Simionescu face parte deja din galeria celor care au întemeiat în ţara noastră o instituţie de anvergură europeană şi mondială, o şcoală, un climat uman de cooperare performantă. Evident că Maya Simionescu alături de remarcabilul şi regretatul nostru coleg, Academicianul Nicolae Simionescu face parte din lanţul marilor valori ale românilor, ale celor care s-au dedicat Şcolii Medicale şi Biologie Celulare Româneşti. Desăvârşirea pregătirii experienţei profesionale a Doamnei Maya Simionescu în climatul cu totul remarcabil al Şcolii de Biologie Celulară a marelui român George Emil Palade i-a permis să-şi identifice menirea de fondator. Cristalizarea şi materializarea acestui proiect, un institut şi o şcoală naţională de Biologie şi Patologie Celulară la Bucureşti a fos

trealizata împreună cu marele profesor George Emil Palade. Acest grup de remarcabilă valoare profesională, morală și patriotică, respectiv Nicolae Simionescu și Maya Simionescu, potențat de generozitatea și forța morală a unui mare român, George Emil Palade a dat dovada performanței lor și a viabilității proiectului lor. Maya Simionescu acum la un mic multiplu de 40 de ani de viață poate privi cu satisfacție parcursul vieții sale personale și profesionale înconjurată de respect unanim, de dragostea colaboratorilor și a colegilor săi. Omagiul meu ar fi probabil prea sumar dacă nu am evoca o esențială latură a triadei ce definește o personalitate consacrată în lumea noastră academică, a Academiei Române, respectiv opera științifică a Doamnei Academician Maya Simionescu. Circa timp de 20 de ani a lucrat în calitate de cercetător sau visiting professor la instituții de mare prestigiu din Statele Unite ale Americii dintre care Rockefeller University, Yale University, McGill University, Columbia University și asa mai departe. În 1970 -1979 a lucrat direct sub coordonarea profesorului George Emil Palade, a publicat peste 600 de articole științifice în reviste de mare prestigiu și vizibilitate, a elaborat monografii, capitole în tratate etc. Recunoașterea științifică pe acest plan rezultă din 6 mii de citări cu un indice Hirsh de peste 50. Domeniile în care s-a ilustrat cu contribuții originale alături de grupul din care a făcut parte sau din colectivele Institutului de Biologie și Patologie Celulară Nicolae Simionescu al Academiei Române sunt: descrierea canalelor transendoteliale , diferențierea joncțiunilor intercelulare în endoteliul vascular din artere și vene, microdomenii de membrană în endoteliul vascular, endocitoza și transcitoza în endoteliul arterial, situsul de legare de vezicule plasmale din endoteliul capilar, caracterizarea celulelor interstițiale din valvele cardiace, receptorii pentru produsi de glicare avansată, etc.

Școala care s-a format în jurul personalității Academicianului Nicolae Simionescu și Academicianul Maya Simionescu în cadrul Institutului de Biologie și Patologie Celulară a dezvoltat multe din domeniile amintite permițând recunoașterea mondială a acestei instituții ca lider în cercetarea endoteliului vascular pentru cercetarea avansată în domeniu devenind Centru European de Excelență.

Stimată colegă, dragă colegă Academician Maya Simionescu atât colaboratorii din institut cât și noi toți colegii vă percepem ca pe o personalitate care în afara valorii performanței științifice sunteți marcată de responsabilitatea de lider al unei comunități științifice remarcabile. Ei ca noi toți vă percepem constant căldura și solidaritatea umană în scopul atingerii unor înalte virtuți academice.

Academician Doina Popov

O sărbătoare specială

Domnule Președinte, Domnilor membri ai Prezidiului Academiei Române, Onorați invitați și colegi, Dear friends, Este un privilegiu și o bucurie pentru mine să vă dezvălui astăzi, fie și pe scurt, câteva gânduri prilejuite de aniversarea doamnei academician Maya Simionescu, o personalitate a comunității științifice și un OM remarcabil.

Aniversarea de astăzi este o sărbătoare specială.

Iată de ce: ….pentru că doamna academician Maya Simionescu (Doamna Maya, cum îi spunem cu

afecţiune noi colaboratorii) este un spirit tânăr; vârsta biologică este doar o cifră, rezultatul unui calcul simplu, bazat pe anului naşterii. Cât neadevăr ascunde acest calcul în ceea ce o priveşte! Om cu resurse intelectuale nealterate de patina timpului, spirit pozitiv cu o neostenită inspiraţie ştiinţifică, ghidând şi veghind asupra direcţiilor de cercetare din institut, cu o statură impresionantă de savant în lumea biologiei şi patologiei celulare a sistemului cardiovascular. Câţi dintre români au astăzi un indice Hirsh 50 şi un număr de aproape 7000 de citări ale operei ştiinţifice (fără autocitări), dovadă incontestabilă a recunoaşterii valorii contribuţiilor sale de către comunitatea naţională şi internaţională în domeniu.

…. o sărbătoare specială pentru că dedicaţia Doamnei Maya pentru institut şi cercetătorii care lucrează sub bagheta sa este admirabilă şi nu încape în suficiente cuvinte. Ce şansă pentru un tânăr cercetător să fie selectat în echipa Institutului de Biologie şi Patologie Celulară "Nicolae Simionescu", să o aibă pe doamna Maya ca mentor, să se instruiască permanent, la doctorat, la manifestări ştiinţifice internaţionale şi naţionale găzduite de institut sau la seminariile de prezentare a progreselor proiectelor aflate în studiu. Dar nu numai atât, doamna Maya este un model de comportare interumană caracterizată prin graţie şi desăvârşită eleganţă.

…. o sărbătoare specială pentru că viaţa Doamnei Maya este un exemplu de succes clădit pe curiozitate ştiinţifică, pe lucrul fără preget de dimineaţă până seara în laborator, la microscop, în analize pertinente ale stadiilor proiectelor în curs, la computer.

Este o perfecţionistă în tot ce clădeşte şi îi educă şi ghidează pe colaboratori în acest sens; stau mărturie multiplele intervenţii pe textele drafturilor lucrărilor ştiinţifice în curs de elaborare, reviziile atente până ajungerea la forma finală cu mari şanse de acceptare la publicare.

….Şi nu în ultimul rând, pentru că personal am simţit căldura sufletească cu care m-a înconjurat în momentele de bucurie dar şi în cele de cumpănă. Sunt sigură că şi alţi colaboratori au găsit la Doamna Maya nu numai mentorul desăvârşit dar și omul cald, înțelept şi luminos care rezonează cu empatie. Era imposibil să-mi imaginez în acel decembrie din 1977, cand am cunoscut-o pe Doamna Maya în Departamentul de Biologie Celulară al Facultății de Medicină de la Universitatea Yale, că aproape 40 de ani din viaţa mea se vor desfăşura în institut, având norocul de a face parte din echipa clădită cu multă rigoare în jurul fondatorilor, acad. Nicolae Simionescu şi acad. Maya Simionescu. Am trecut treptat din rândul tinerilor, în cel al maturilor şi apoi al seniorilor, cu crescândă admiraţie şi recunoştinţă faţă de Doamna Maya, pentru tot ce a dăruit şi dăruieşte neobosită ştiinţei şi colaboratorilor, sub inspirata sa deviză, "imposibilul nu există". Concluzionând, de data aceasta în limba engleză, îi putem spune: "YES, you can, and YES, with you we can. YES, you do a great job". Happy birthday to you DOAMNA MAYA. LA MULTI ANI, DOAMNA MAYA.

Acad. Lucia-Doina Popov 23.02.2017 Textul a apărut în revista Academica, Februarie-Martie 2017, p. 30

Academician Anca V. Sima

Profesorii nostri, Nicolae și Maya Simionescu, și școala de la IBPC-NS

În această zi de sărbătoare am să vorbesc despre cei aproapre 40 de ani pe care i-am trăit alături de doamna Maya în Institutul de Biologie și Patologie Celulară, și mai important despre ce am învățat de la doamna Maya, ce cred că am învățat de la doamna Maya. În primul și în primul rând, am înțeles din prima clipă ceea ce s-ar putea numi în engleză "the thrill of science", adică în limba română pasiunea pentru știință. Și un pic mai mult, ce important este ca ceea ce faci să fie bine făcut, ce înseamnă munca pasionată și susținută, eleganța fără ostentație, atât în știință cât și în cod vestimentar, dragostea și fidelitatea reciprocă în multe situații, dacă nu chiar în toate. Ce nu am învățat de la doamna Maya, dar cred că mai am timp, diplomația ca armă și metodă, feminitatea ca înveliș al hotărârilor bărbătești, îngăduința ca semn al puterii, nu al slăbiciunii. De mult, în anul 1979, am participat la concursul de intrare în Institutul de Biologie și Patologie Celulară, ceea ce a însemnat mulți candidați pe un loc și multe emoții. Imaginea pe care o păstrez de atunci, din prima zi de interviu, a fost a unei doamne înaltă, frumoasă, cu niște ochi albaștri mari și o privire deschisă. Am avut un interviu și cu domnul profesor Nicolae Simionescu, dar nu-mi mai aduc aminte nimic, fiindcă emoția a fost ceva teribil. După câteva zile, probabil am făcut impresie bună, pentru că doamna Maya m-a luat chiar în laboratorul pe care îl conducea atunci, laboratorul de organele celulare.

Acum o să vorbesc ceva despre cum am învățat biologia celulară de la doamna Maya, așa cum, la fel ca mine, foarte mulți tineri au învățat, adică prin metoda propriului exemplu. Am stat lângă dânsa la microscopul electronic, ore întregi; asta se putea întâmpla ziua, dar s-a întâmplat și în orele târzii ale serii, spre noapte, când examina diferite preparate pentru studiile care se făceau în insititut. Vreau să spun că și acum simt exact ce vă spuneam, "a thrill". Ceea ce-mi arăta pe ecran în liniștea și lumina aceea verzuie (dacă ați fost la un microscop electronic știți că atmosfera e cu totul specială în preajma lui) nu voi uita niciodată; acolo am văzut pentru prima dată celule, organele, joncțiuni și mi se părea, așa cum povestea doamna Maya, că îmi împărtășește secretele unei lumi! Pentru că doamna Maya a avut întotdeauna, și spre marea mea mirare are și în prezent, o infinită răbdare în a îndruma tinerii și a-i determina să învețe, sfatul cel mai bun fiind "fă și tu". Ce cred că este important din această învățătură pe care am căpătat-o în Institutul de Biologie și Patologie Celulară este că un om de știință trebuie să se dezvolte armonios, nu este suficient să aibă numai cunoștințe ale cercetătorului științific, și în acest sens profesorii noștri Maya și Nicolae Simionescu au fost modele desăvârșite. Au înțeles foarte bine că educația unui tânăr nu înseamnă să umpli un vas gol, ci mai degrabă să îmblânzești o flacără. Aș zice că cu cât tânărul este mai capabil, cu atât flacăra e mai puternică și mai greu de îmblânzit; toată lumea care îndrumă studenți știe asta. După plecarea profesorului Nicolae Simionescu, doamna Maya a trebuit să acopere munca a doi oameni, numai că nu erau doi oameni obișnuiți, ci amândoi excepționali prin energia și cunoștințele pe care le aveau. Doamna Maya a ales să mențină școala de la IBPC, a continuat să învețe tinerii, să-i strângă în jurul dânsei, să organizeze petrecerile de Crăciun, nu numai la institut cum se făcea pe vremea când trăia profesorul, ci și la ea acasă, să-i învețe să danseze, să cânte și să se bucure de viață. A extins această școală locală a IBPC-ului în cursuri post universitare de școala biomedicală pe care

le-am ținut timp de 9 ediții și unde au fost bineveniți și au învățat tineri din întreaga țară. Îmi place foarte mult ce spunea profesorul Jean Charles Fruchart de la Universitatea de Medicină și Farmacie din Lille, care cu ocazia unei astfel de școli a venit și a ținut un curs în anul 2004: „școala organizată de Maya Simionescu a fost de ținută științifică foarte înaltă, comparabilă cu cele din Europa și SUA". Legat de institutul nostru spunea: „sunt de-a dreptul impresionat de valoarea științifică a cercetărilor din acest institut. Bravo Maya pentru că ai știut să motivezi atâția tineri excelenți și să le dai speranță". Aș zice că eu văd pe lângă capacitatea aceasta extraordinară a doamnei Maya de a nu admite că imposibilul există și ceea ce Robert Barro spunea: "acolo unde cei înfrânți văd bariere, învingătorii zăresc trambuline"; este caracteristic pentru doamna Maya.
Doamna Maya alături de profesorul nostru a pus în condiții grele temelia unui institut care și-a dobândit un statut recunoscut și faimă internațională, a creat și dezvoltat Școala de Biologie Celulară Românească, este Președinte al Societății Române de Biologie Celulară în ultimii 20 de ani, a antrenat științific 4 generații de tineri, din care peste 50 sunt proprii doctoranzi; mulți au rămas în institut, au avansat și dau exemplu aici. În continuare sunt angajați foarte mulți tineri în institut, este politica doamnei Maya și după cum vedeți numărul articolelor de-a lungul anilor a crescut și în ultimii ani pot spune că s-a dublat prin munca comună condusă de doamna Maya.
Dragă doamna Maya, acum la ceas aniversar, cu respect, cu admirație, cu multă dragoste și recunoștință, vă doresc LA MULȚI ANI, multă putere și răbdare pentru a continua cu dăruire și pricepere formarea viitoarelor generații de tineri!

Dr. Ileana Mânduțeanu
m.c. Academia Română

Maya Simionescu: Imposibilul nu există

Sunt una din cercetătoarele care am fericirea, privilegiul și onoarea să avansez împreună cu Doamna Maya in "Țara Științei și Lumea celulelor" de peste 37 de ani. Dna Maya, este pentru mine model, mentor și colaborator, iar, pentru anii frumoși petrecuți împreună, îmi exprim profundă afecțiune și gratitudine !
IMPOSIBILUL NU EXISTĂ este crezul profund al Doamnei Maya, care m-a impresionat în așa mare măsura încât practic l-am asimilat. Iar realizările de excepție ale Doamnei Maya sunt mărturii că..imposibilul nu există!

Astfel, părea imposibil în perioada '70-'79 să înființezi un Institut de Cercetare după propria concepţie, şi totuşi ... Dna Maya şi Domnul Profesor au reuşit să transforme visul lor în realitate: înființarea primului Institut de Biologie şi Patologie Celulară în România. La început a fost concepția, elaborarea unui plan amănunțit de acțiune, realizarea schițelor laboratoarelor, repartizarea lor în clădire, elaborarea fluxurilor tehnologice. Apoi, treptat, în ciuda obstacolelor, birocrației, visul a început să prindă contur. În 1979 a fost inaugurat Institutul de Biologie și Patologie Celulară- IBPC. Dna Maya și dl Profesor au realizat " transplantul de adevărată viaţă ştiinţifică, de cercetare " în Romania, au creat un centru modern de biologie celulară, au format o Școală de Biologie Celulară. A fost o inaugurare de neuitat la care au participat oameni de știință de prestigiu,

doi premianți Nobel, un viitor premiant Nobel, și mulți prieteni și colaboratori ai doamnei Maya și ai dl Profesor. Profesorul George Emil Palade , scria atunci în cartea de aur a Institutului că "o fereastră s-a deschis spre viitor…" Dar, în 1980 au fost tăiate fondurile pentru cercetare, și, din nou, doamna Maya și domnul profesor au demonstrat că

„ imposibilul nu există".

Părea imposibil, în perioada '80-'89 să obții finanțare din SUA pentru cercetare în România. Şi totuşi... Institutul de Biologie şi Patologie Celulară a obţinut Granturi timp de 12 ani, acordate de NIH (Institutul Național pentru Sănătate), primele şi singurele granturi acordate unui institut de cercetare din Europa de Est. Părea imposibil ca 2 cercetători din România, de la acelaşi institut să fie recunoscuţi simultan pe plan mondial. Şi totuşi... Nicolae şi Maya Simionescu au ajuns să fie recunoscuţi pe plan mondial, ca lideri în cercetarea endoteliului vascular, iar institutul a devenit centru de avangardă în domeniu, mai mult, și acum, doamna Maya și domnul profesor sunt incluși în galeria mentorilor de excepție la nivel European.

Părea Imposibil, şi totuşi, după 1995, când, domnul profesor „a fost răpus cu blândețe de o boală pe care a studiat-o toată viața", cum spunea domnul profesor Palade, "Maya a fost de admirat, ca de obicei. În stilul tipic Simionescu ea a continuat să lucreze cât doi. Părea imposibil şi totuşi …Dorinţa s-a transformat în realitate "Principiul: primeşte şi dă mai departe s-a transmis şi a funcţionat mereu, iar realizările de excelenţă ale tinerilor din IBPC stau mărturie că... Imposibilul nu există... Astfel, 4 generaţii ale Familiei Ştiinţifice IBPC au fost formate la standardele înalte morale şi ştiinţifice "Simionescu" iar lucrările lor ştiinţifice sunt recunoscute de comunitatea ştiinţifică internaţională, cu peste 6000 de citări. Institutul nostru a ajuns acum la maturitate și, îi dorim și lui din toată inima "La mulți ani!", Ne continuăm drumul în știința și viață conduși de dna Maya care n-a încetat să ne demonstreze și să ne transmită că „Imposibilul nu există". Suntem conștienți că , așa cum spunea dl profesor, „nu se poate construi nimic durabil dacă în construcție nu se pune suflet". Și, după cum noi știm că nu putem să devenim ceea ce admirăm fără să dăruim, ne continuăm drumul conduși de doamna Maya Simionescu și suntem convinși că și în continuare ghidați de dânsa o să reușim să descoperim noi minuni în lumea științei și în universul celulelor . Doamna Maya mărturisea :"Regret că nu am talentul și răgazul să scriu o carte despre Imposibilul nu există."

Doamna Maya, realizările dumneavoastră de excepție sunt mărturii că " Imposibilul nu există". Ați clădit împreună cu dl Profesor, un institut, o instituție de gândire și cercetare, o școală, ați pus o temelie pentru generații care contribuie la reușitele cercetării acum și în viitor! Dragă dna Maya, vă multumim mult , vă iubim , și vă urăm din toata inima „La multi ani" să fiți mereu alături de noi și să fiți mereu un prilej de inspirație pentru mulți, mulți tineri și mai puțin tineri care așteaptă să aibă șansa să fie alături de dumneavoastră. La mulți ani!

Prof. Jean Jaques Askenasy

membru de onoare al Academiei Române

Un preambul. În anul 1682 un medic englez William Harvey scrie cartea "De motu cordis", despre mișcarea inimii și el stabilește un adevăr universal adică circulația sângelui în corpul nostru este un sistem închis care este realizat de o masă musculară de mărimea unui pumn care bate de 100 de mii de ori pe zi, de 2,5 miliarde dăți într-o viață și ea realizează un impuls care permite un circuit închis al unei cantități de 5 până la 6 litri de sânge care conduc pe o traiectorie egală cu dublul Ecuatorului adică de 80 de mii de km dacă punem toate vasele cap la cap inclusiv capilarele și venele și permite o circulație permanentă în timpul vieții a acestui sânge care conține în el milioane, trilinoane de celule roșii, celule albe, derivate de hrană pe care le ingerăm în fiecare zi plus oxigenul pe care alveolele noastre pulmonare îl extrag din sânge. Trec 2 secole și se descoperă un alt adevăr universal și anume: există o entitate independentă în corpul nostru care reprezintă un univers de sine stătător și aceasta este celula. Niște iluștri medici, Schwalen și Virchow, realizează acest adevăr universal, acest lucru permite unui medic elvețian să identifice în 1865 celula endotelială.

Și acum, în acest moment, dați-mi voie să-l citez pe filozoful Friedrich Nietzsche care spune următoarea înțelepciune: "Măiestria și măreția unui om nu este în a fi o țintă ci în a fi o punte", noi toți aici de față suntem punți. Punțile pe care le realizează doamna academician Maya Simionescu în concepția mea, îmi permit s-o spun aici, sunt 4 punți pe care le voi releva, prin cele 3 monografii, 50 de capitole în cărți și peste 300 de articole științifice originale publicate în 11 țări doamna Maya Simionescu descrie această celulă endotelială și de aceea îmi permit din momentul acesta în prezeantarea mea s-o numesc Doamna Endoteliluilui Maya sau Endothelial Lady Maya. Ea în afară de calitatea de celulă de căptușeală care permite pe o traiectorie de 80 de km de vase cursul lin al acestui sânge dătător de viață, îndeplinește o serie de alte funcții care au fost relevate în toate cercetările ei și anume funcții enzimatice ,produc citokine, și tot felul de substanțe care permit coagulabilitatea și permeabilitatea în special la nivelul capilar și acest lucru este legat de procesele de ateroscleroza, de diabet care conduc la marile drame ale vieții noastre cum este infarctul miocardic și accidentele vasculare cerebrale care sunt produsele patologice ale acestor vase.

Doamna Endoteliului Maya se mai ocupă de aspectele cancerigene ale angiogenezei, producerea de capilare noi are și un efect cancerigen pe care dânsa îl studiează și-l analizează. În afară de acest lucru în ultimii ani Doamna Endoteliului Maya se ocupă de celulele progenitoare, de celule endoteliale și prin aceasta intră în primul front științific al biologiei și anume în celulele sușe. De altfel mâine, la institutul de Biologie vom auzi o serie de conferințe la care vor participa și cercetători din prima linie științifică a Israelului care vor prezenta probleme de imunitate și de alte subiecte științifice.

A doua punte pe care vreau s-o menționez este o punte națională, o punte politică, după cum s-a vorbit aici mai înainte despre pătrunderea imposibilului, concepția de imposibil a doamnei endoteliului Maya vreau să spun că acest institut de biologie a fost creat în condițiile cortinei de fier, este un iluminism, este o străpungere a imposibilului prin posibil în aceste condiții, bineînțeles ajutată de soț și de Palade realizează acest institut de Biologie cu care ne mândrim astăzi. Este un subiect care cred că istoricii și politologicii ar trebui să-i inchine o atenție deosebită.

A 3-a punte este puntea morală, puntea maritală, dacă Beethoven în opera sa Fidelio realizează prin cântecul

Leonorei să arate că este în stare să-l salveze pe Florestan, soțul ei, doamna endoteliului Maya lucrează și închină cei 47 de ani de activitate științifică institutului pe care îl numește institutul Nicolae Simionescu, numele soțului ei. A 4-a punte și cu aceasta închei, este puntea case semnifică importanța ei internațională și anume lucrările dânsei de la Universitatea Yale și de la Universitatea Columbia unde a primit premiul Ludwig Shepherd, semnificația internațională a lucrărilor ei, această seminificație este o semnificație nu numai a persoanei ci a Academiei și a țării românești. Pentru toate aceste lucruri eu consider că-i datorăm lui Maya Simionescu cu toții, cu toată Academia tot respectul nostru și mai presus de orice toată dragostea noastră, Maya fii binevenită în grupa prefixului de 80 din care fac și eu parte.

Doctor Elena Butoi

IBPC-NS

Stimați domni academicieni, profesori, prieteni și invitați ai doamnei Maya, dragi colegi,

De-a lungul vieții rar se întâmplă să întâlnești oameni deosebiți, față de care nu ai decât admirație și cuvinte de laudă. Mulți excelează într-o anumită direcție și te uimesc fie prin cunoștințele lor într-o anumită profesie, artă, fie printr-un talent deosebit. Alții se evidențiază prin bunătate, empatie sau perseverență. Însă și mai rar poți să întâlnești o persoană în care să se găsească cele mai alese însușiri care ar trebui să caracterizeze omul în adevăratul sens al cuvântului. A apărut în viața mea în anii studenției, moment în care eram la finalul facultății de fizică și încă nu știam ce vreau să fac, nu voiam monotonie. Dar pe atunci nu mă gândeam că o să-mi schimbe viitorul sau o să mi-l influențeze.

Este vorba de academician Maya Simionescu, doamna Maya cum îi spunem noi, doamna care împreună cu profesorul Nicolae Simionescu au fondat în anul în 1979 Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu", implementând astfel țara științei, așa cum spunea odinioară dumneaei; o țară mică cartografic, însă imensă științific, cu multe provocări, bucurii și satisfacții, dar și cu framântări, întrebări fără răspuns, neliniști în egală măsură. Acest tărâm, vegheat la început de doamna Maya și domnul profesor, iar acum doar de doamna Maya, își influențează inevitabil locuitorii care iubesc știința, celula, experimentul, provocările și nu monotonia. Pentru mine totul a început în urmă cu un deceniu și jumătate, când am fost acceptată să lucrez în acest tărâm al științei. Încă din primii ani, am început să primesc învățare și încredere de la doamna Maya, în primul rând datorită capacităților extraordinare pe care le posedă de a transmite și de a fi un bun ascultător în egală măsură.

De-a lungul anilor, datorită personalității deosebite a doamnei Maya, răbdării nemărginite și iubirii împărțite egal, dar și datorită cuvintelor care dojenesc dar învață, a cuvintelor care laudă dar și îndeamnă la perfecționare continuă, dăruite ani în șir cu dragoste, noi, locuitorii acestei țări mici dar nemărginită, ajungem să descifrăm unele din tainele științei.

Cine a cunoscut-o pe doamna Maya, nu poate să nu simtă emoție în preajma dumneaei. Cine a învățat de la doamna Maya, nu are cum să nu știe să scrie o lucrare.

Cine a ascultat-o pe doamna Maya, nu are cum să nu-și dorească s-o asculte din nou. Dacă ai noroc să întâlnești un astfel de om în viață, ascultă, învață, fii atent la ceea ce zice și ce face. Fă-l să se simtă mândru că ți-a fost cândva profesor, prieten, sfătuitor.

Vă mulțumim, apreciem, respectăm și iubim pentru toată munca și dăruirea pe care o semănați ani de-a rândul, în fiecare nou locuitor al acestui tarâm fascinant. Și închei cu un citat al lui Petre Țuțea care spunea: „o personalitate este aceea care se dăruiește, nu se justifică". Asta face doamna noastră de ani de zile.
La mulți ani, doamna Maya!

Prof.Dr. Doina Dimulescu

Director , spital Elias

Domnule președinte, Monseniore, stimată și iubită doamnă academician, domnilor academicieni.
Va fi foarte greu pentru mine să mai spun ceva care să depășească lucrurile înțelepte , sensibile, care s-au spus până acum despre doamna, minunata doamnă pe care o sărbătorim astăzi, iată, până și Doamna Endoteliului, s-a mai spus deja, nu am vorbit nimic cu domnul profesor Askenasy de tema asta, mi-a rămas în minte felul în care a prezentat-o cu niște ani în urmă regretatul profesor academician Laurențiu Popescu într-o conferință și a spus: „Acum va vorbi Doamna Endoteliului". Și mi s-a părut că se potrivește foarte bine cu profilul doamnei academician, profilul științific, uman, distincția domniei sale. Voi vorbi câteva lucruri despre relațiile noastre în lumea cardiologilor clinici, clinicieni cu doamna academician și cu extraordinara instituție pe care o conduce.

Prezența doamnei academician a fost frecventă la mai toate manifestările științifice importante ale cercetărilor manifestărilor științifice cardiologice din țară și a prezentat de mai multe ori conferințe științifice extrem de interesante și importante pentru lumea noastră de practicieni privind ultimele progrese dar și remarcabilele realizări ale domniei sale și ale colectivului pe care îl conduce, privind patologia endoteliului, privind aterogeneza și evenimentele aterotrombotice cu care noi ne confruntăm atât de frecvent în lumea contemporană și care, cum bine știți, omoară un mare număr de români, aflându-ne noi, din acest punct de vedere, într-un nedorit clasament, către topul clasamentului în Europa și în lume ca nivele de mortalitate. Și mai mult decât atâta, dincolo de fascinația pe care doamna academician o exercită ca om de știință, și ați văzut și dumneavoastră cât de neobișnuită este această lungă listă de publicații și de studii importante care s-au făcut într-o vreme în care era o mare problemă să găsim reviste americane de cercetare, reviste americane de știință, era o mare problemă să avem tratatele americane de medicină
Dincolo de aceste lucruri pe care toată lumea le-a amintit aici și care sunt absolut extraordinare, aș vrea să vă vorbesc câteva cuvinte doar despre extraordinara căldură, prietenie și talent cu care a știut doamna academician să-și atragă în institut specialiști din alte specialități conexe, să întindă punți, cum foarte frumos a spus domnul profesor Askenasy, către lumea care ar trebui să înțeleagă mai bine cercetarea fundamentală, către lumea care ar putea să contribuie la progres utilizând datele din cercetarea fundamentală și, de ce nu, către lumea care ar putea contribui la direcții noi de cercetare interdisciplinară, prin proiecte doctorale sau prin proiecte de cercetare. Așa am avut și eu cu câțiva din colegii mei, privilegiul de a colabora cu doamna academician și grupul de cercetători conduși de doamna academician Anca Sima într-un proiect de cercetare comun timp de câțiva ani; și am descoperit acolo o altă lume, o lume mai

vie,mai entuziastă şi mai motivată decât lumea din care veneam noi cu binecunoscutele probleme şi poveri ale activităţii de îngrijire medicală în spitalele româneşti şi cu dificultăţile pe care le cunoaşteţi cu toţii. Am avut acolo timp de câţiva ani un refugiu intelectual, un loc care mi-a produs prima dată dorinţa de a fi fost cu câteva decenii mai tânără pentru a fi avut poate o carieră în cercetare. Experienţa a fost extraordinară pentru noi ca şi clinicieni. Tema de cercetare a fost provocatoare: identificarea unor biomarcări care să ne ajute să găsim acei pacienţi cu boală coronariană stabilă care se află la risc major de a dezvolta complicaţii aterotrombotice generatoare de infarct miocardic, înainte ca aceştia să ajungă la evenimentele catastrofice. Discuţiile ne-au dus spre înţelegerea profundă a unor mecanisme biologice în care date despre microRNA, despre matrixmetaloproteaze, despre HDL-ul disfuncţional, despre parooxonază şi celule progenitoare endoteliale nu au mai fost sau nu au rămas doar o colecţie de informaţii pe care le lecturam din revistele de cercetare, ci teme de gândire privind rolul lor în patogenia plăcii instabile şi în vulnerabilizarea pacienţilor care dezvoltă sindroame coronariene acute. Am avut onoarea de a fi coautor cu grupul de la lipidomică din institut condus de doamna academician, la lucrări publicate şi prezentate la congrese române şi congrese internaţionale de cardiologie şi vreau să vă spun că am fost extrem, extrem de mândri că noi, ca şi cardiologi, am putut avea acele date, am putut da explicaţii şi am putut vorbi cu lume din străinătate care venea să ne întrebe : dar cum aţi făcut, dar cum s-au descoperit aceste lucruri?

Vă doresc, doamnă academician, să continuaţi să fascinaţi, să inspiraţi generaţii tinere şi să-i atrageţi spre cercetarea fundamentală, care la prima vedere nu pare un domeniu foarte atrăgător, aşa cum şi noi am fost atraşi spre una dintre cele mai valoroase experienţe profesionale din viaţă, alături de dumneavoastră în aceşti ultimi ani. Aţi demonstrat în toţi aceşti ani de când vă cunosc mai bine, că aţi reuşit sau că victoriile cele mai importante sunt acelea pe care toată lumea le consideră imposibile sau aproape imposibile.

Vă doresc mulţi ani şi tinereţe.

Profesor Shlomo Sasson

Hebrew University ofJerusalem

Profesor Shlomo Sasson

It is really a special occasion for me to be here at this celebration of Maya's Birthday and I first want to extend the greetings not only of myself and my wife Vanda but also of many Israelian scientists and colleagues and students who had come and visited and collaborated with Maya and other scientists in this institute.

And now I want to go back, about 1500 years to some of the writings of what we call... the wisdom of our fathers who, really phased the years of people's life.

The age of 20 is the age of pursuit, you start to think what am I doing, what is the reason of my life, what shall I do, some people go to commerce, some people go to study and at that time like many of us, Maya, started to think about an academic career of pursuing knowledge in the area of life sciences.

The age of 30 is considered the age of strength, when you acquire knowledge, degrees and you have to start your way, you have to be strong since it is not easy to find your way in the scientific society and I should add, it is harder for women. So at this time of strength Maya had to stand on her own and pursue a career, a brilliant career that gives her the solid bases for what she had accomplished in the years to come.

Age of 40 is considered the age of understanding, you have acquired knowledge and now you start to think what am I going to do in the midlife, am I going to stay in America, I am talking about Maya, or we should really

start something totally new, an adventure, to start an institute in Romania, in Bucharest. I think at that time was considered an unimaginable task; in the 70's was an impossible dream. The regime was different, the country was different and things were oppressive and yet the dream started to become a reality.

After the age of understanding Maya and Nicolae Simionescu, according to our scripture, comes the age of council. You not only bring things for yourself and establish yourself, now you start to give council to other people, now you become a mentor, you become a leader, you become a head of a bigger organization. It is not your own research that you pursue, it is not your own career, it is not the papers you are publishing... you are now responsible to many other people, you enlarge your family, that is now really big, and give them the advice and the council how to work in harmony together, how to pursue a research in a joined manner.

Then comes the age of 60, according to our fathers that's the age of maturity. You have to settled down, you can look back and you can perceive how to progress, what to do next, you don't just sit relaxed, it is really the age that you have consolidated enough knowledge, enough talent, enough means to make it bigger and more successful.

Age of 70 is defined as the age of wise head, of wisdom, when you realize what you did wrong, what you did well and by doing that you know how to progress further and to make it better.

Then comes the age of 80 and surprisingly our ancestors defined the age of 80, the age of super added strength (30 was the age of strength) and again at the age of 80 is super added strength.

And why did I title my talk as "Forever young, Maya.", I tell you. Because being young is not being defeated by failures, is really the way to approach life, every day, every challenge with the freshness, with juveness, being able to erase your past and look forward as you have just started having high expectations and believing, and hoping for something new.

We are all gathered today to really celebrate Maya's ability to really be at the age of 30, strong as in age of 40, being able to lead a big team of people, a big institute, very important, not only in Bucharest, not only in the Romanian Academy, not only in Romania but in Europe, in the Scientific World at large.

I have no doubt that Professor Maya Simionescu is the symbol if being young always and being remembered young always. Thank you, Maya.

Prof. Dontscho Kerjaschi

University of Wien, Austria
Memories of ICBP-NS in 1989
Excerpts

Vienna, spring 1989. The mails bring a letter of invitation for me to participate as speaker at the week-long celebration of the 10th anniversary of the ICBP. The faculty was impressive and comprised most of the luminaries of cell and vascular biology, including George Palade from Yale, Gunter Blobel from Rockefeller, Ramzi Cotran and Michael Gimbrone from Harvard, and Joseph Witztum from UCSD, to name a few, and of course the hosts, Maya and Nicolae Simionescu.

We were greeted in a special section of the airport by Nicolae and transported to our hotels.

……. The lectures were given at the completely filled ICBP auditorium.

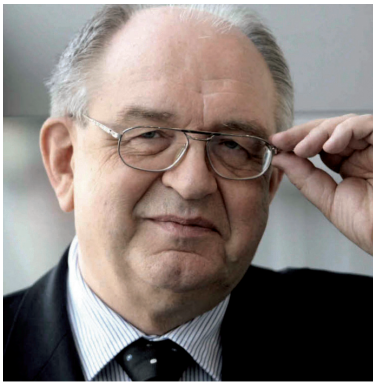
One evening the otherwise omnipresent Nicolae had disappeared and Maya told us that he did not feel well. Many years later Nicolae told me that on that evening the Securitate had accused him to give away Romanian research secrets to the foreigners, in order to put pressure on him to move the ICBP away from its present location because its place close to the palace was needed for a garrison. This was for us foreigners a glimpse into every-day life in these days and makes the achievements of the Simionescus even more admirable.

Now, unbelievable 40 years later, many of the guest speakers of that meeting are gone: Nicolae, Palade, Blobel, Cotran. What remains in our memories is the deep hospitality of our hosts and the enthusiasm of the people working in ICBP.

Several visits in later years have confirmed the impression that what Nicolae and Maya have seeded keeps growing and constitutes a milestone in the scientific development of central Europe.

Prof. Werner Franke

University of Heidelberg
Germany
Excerpts



.....The first and the most important moment for cell biology in this country were the few days in September 1979, the very days when the institute was founded..

....The institute was the dream of the Simionescus and not only a dream. I must admit we could not think it would ever be possible imagine in this cold war, in the days of Ceausescu. And here would come an absolutely cosmopolitan world-opened, research-oriented, free institute. This was the dream of Simionescus and Palade devotion in science in his native Romania, his reputation and prestige, were key factors, a whole mark in the development of cell biology in this country.

....and that was a real broad birth of cell biology in this country and this is something very rare on this planet, a couple, in this case the Simionescus, a couple creates really top science from scratch in the country, and since then cell biology in Romania and of Romanians are high recognizable,

I had to organize for 1980, the Second World Congress of Cell Biology in Berlin. That really fell into the trap of the

cold war because then, shortly before the Congress the organization collapsed because the Soviet Union had decided to invade Afghanistan and some of the western countries did not participate to the Olympic Games in 1980 and also to other meetings. A number of people did not come; we had many participants from Russia and only 3 were allowed to come.

And then on the second day of the meeting, there were yells through the hall... "the Romanians are coming, the Romanians are coming", I remember, it was like an invasion, the two Simionescus with only young people, a dozen or so... We managed very quickly, Maya must admit, to get location to sleep, to eat, etc, for them. This was also a success for the meeting. Since these days we have in Bucharest the Romanian cell and molecular biology as an integral part of the European cell and molecular biology.

We should take a moment and remember one person, Nicolae, who was particular energetic and he was the one that you could sense his medical training and the link he wanted to have between cell biology, molecular biology and the applications in medicine.

There was also another aspect. Today in Germany, a student or a graduate student for an exam about the blood, has as a part of the obligatory learning books by Palade and by Maya and another one by the Simionescus.

....Related to diseases, Maya gave us a very fundamental honorable lecture in Heidelberg. I must say since those days I had to come with many of my colleagues to Romania, again and again ...we had excellent meetings in the pathology of diseases.

....However, I want to tell to the young people that the days of the discovery are not over. There are still new things to discover

....I could continue with a number of examples to show that Western Europe is generally very close in many aspects to Romania. Science is one of them but Cell Biology and Molecular Biology is a very strong part and certainly when I see Maya a good deal of merit goes to her.

Romfilatelia a dedicat un plic filatelic aniversar acad. Maya Simionescu

2017

Director Romfilatelia doamna Cristina Popescu

2018

A 12-a Conferintă de Proteomica a Europei Centrale si de Est

Proteomics is a systems approach for the global study of protein expression changes. It can provide information on gene function, disease processes and mechanisms of drug action at several stages in the drug discovery pipeline and pave the way for improved and faster implementation of drug discovery strategies. Since proteomics encompasses a number of multi disciplines, it has a major role to play in our understanding of biological processes and diverse diseases.

The greatest promise for the detection and treatment of diseases lies in the deep understanding of molecular basis for disease initiation, progression and efficacious treatment based on the discovery of unique biomarkers. Although progress in genomics has been rapid during the past few years, it only provides us with a glimpse of what may occur as dictated by the genetic code. In reality, we still need to measure what is happening in a patient in real time, which means finding tell-tale proteins that provide insight into the biological processes of disease development. This is because genes are only the "recipes" of the cell, while the proteins encoded by the genes are ultimately the functional players that drive both normal and disease physiology.

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"
8, B. P. Hasdeu Street, PO Box 35-14, Bucharest, Romania
phone: (+4021)319.45.18; fax: (+4021)319.45.19
https://ceepc2018.wixsite.com/bucharest

ROMANIAN ACADEMY

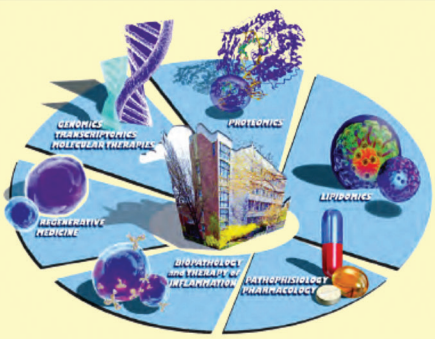
CENTRAL AND EASTERN EUROPEAN PROTEOMIC CONFERENCE
CEEPC

INSTITUTE OF CELLULAR BIOLOGY AND PATHOLOGY "NICOLAE SIMIONESCU"

The 12th Central and Eastern European Proteomic Conference

jointly with

The 39th Anniversary of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"



ADVANCES IN PROTEOMICS AND PROGRESS IN PRECISION MEDICINE

BOOK OF ABSTRACTS

October 24-26, 2018, Bucharest, Romania

The 12th Central and Eastern European Proteomic Conference
jointly with
The 39th Anniversary of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"
ADVANCES IN PROTEOMICS AND PROGRESS IN PRECISION MEDICINE
October 24-26, 2018, Bucharest, Romania

3 CERCETATOARE DIN ICBP-NS AU CISTIGAT PREMII/BURSE L'ORÉAL-UNESCO "FOR WOMEN IN SCIENCE"

3 WOMEN FROM ICBP WON "FOR WOMEN IN SCIENCE" L'ORÉAL-UNESCO FELLOWSHIPS:

1. Maya Simionescu -L'Oreal Special Honor Award for Women in Science (2001) ;

2. Elena Butoi - For Women in Science (2011) ;

3. Monica Tucureanu - For Women in Science (2018) .

UNIUNEA EUROPEANĂ

Instrumente Structurale 2014-2020

Proiect THERAVALDIS

-Proiect complex în care sunt implicate mai multe laboratoare din IBPC-NS-

Titlu: **Terapii tintitie pentru boala valvei aortice in diabet**

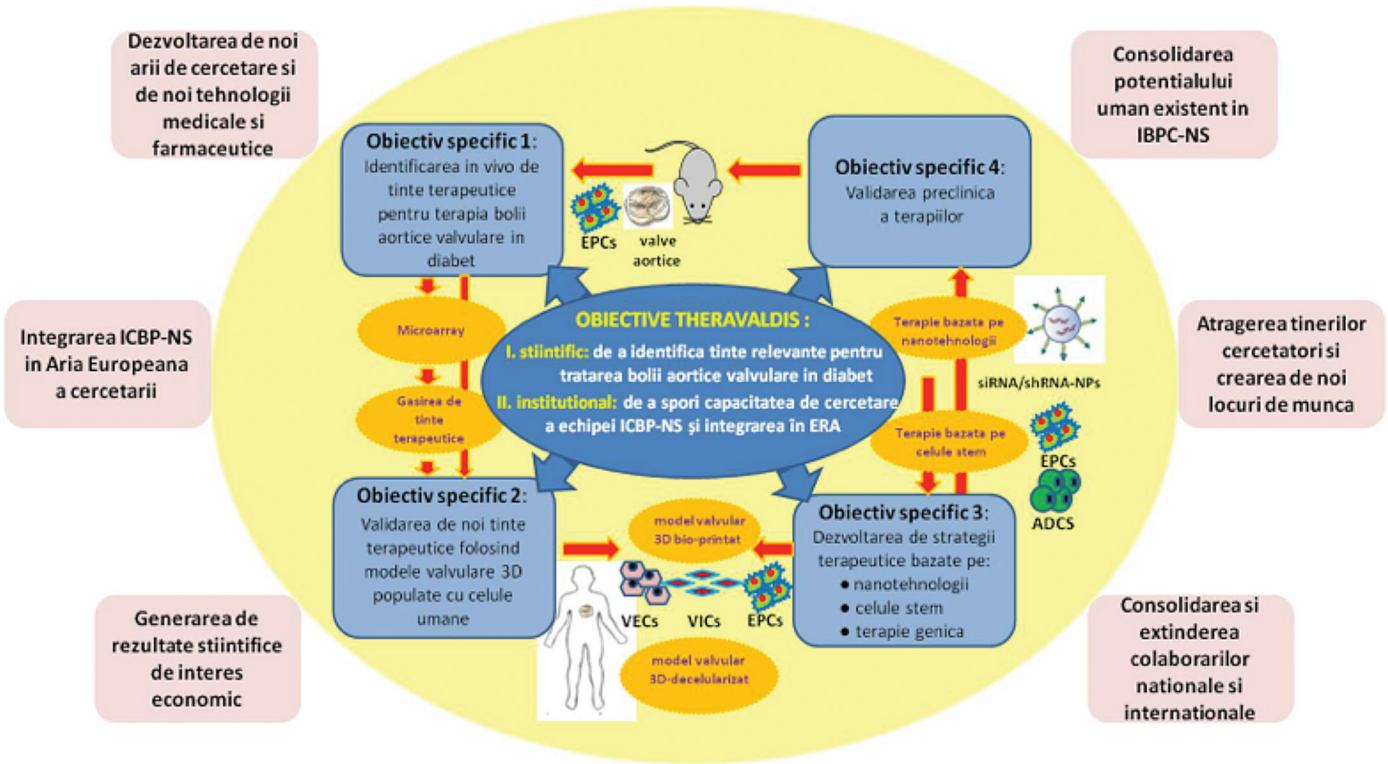
Coordonator: Dr. Agneta Simionescu, Universitatea Clemson USA

Coordonator român: Dr. Ileana Manduteanu, ICBP "N. Simionescu"

Obiectivul general al proiectului THERAVALDIS îl reprezintă creşterea participării româneşti în cercetarea la nivelul UE în domeniul biotehnologiei medicale şi farmaceutice prin crearea unui nucleu de cercetare în nanotehnologii în cadrul Institutului de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu".

Scopul proiectului THERAVALDIS îl reprezintă cercetarea fundamentală şi experimentală în vederea identificării mecanismelor unice ale progresiei bolii valvulare şi dezvoltării de noi nano-bio-terapii pentru boala valvei aortice în diabet (BVAD).

Schema planului de realizare a proiectului Theravaldis



UNIUNEA EUROPEANĂ

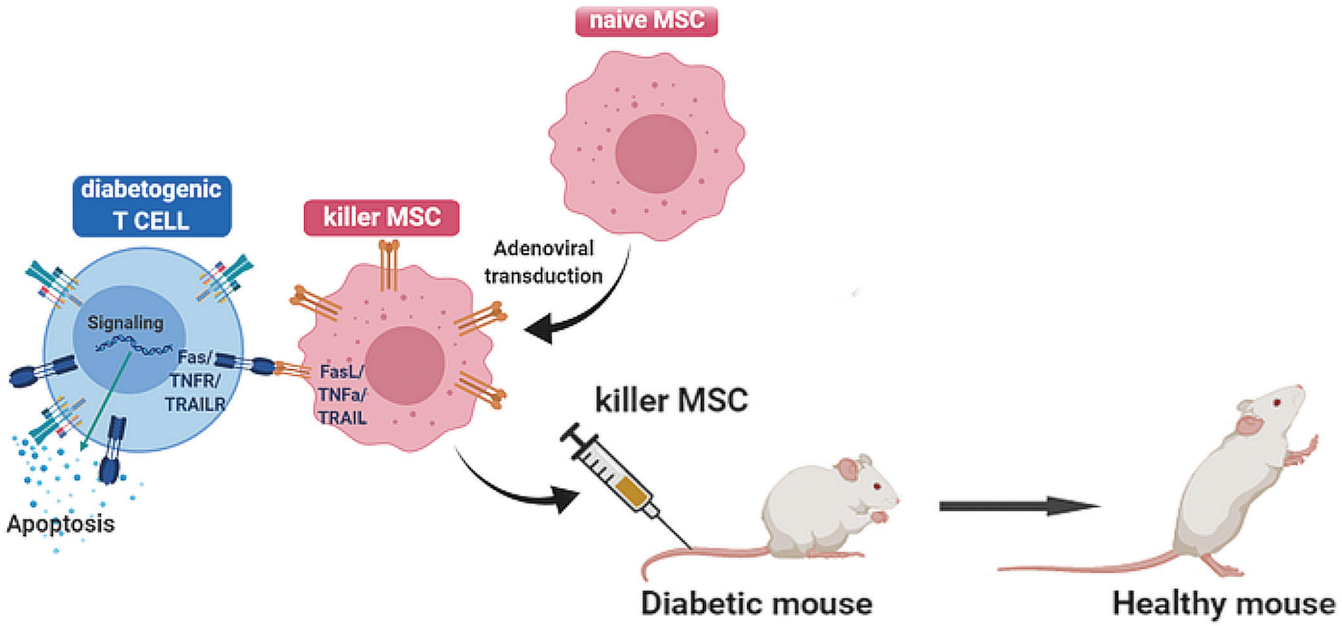
Instrumente Structurale 2014-2020

Proiect DIABETER

-Proiect complex în care sunt implicate mai multe laboratoare din IBPC-NS-
Titlu: Îmbunătățirea competitivității instituționale în domeniul diabetului de tip 1 prin dezvoltarea unui concept inovator de imunoterapie cu celule stromale mezenchimale

Coordonator: Dr. Nadir Askenasy, Schneider Children's Medical Center, Israel.
Coordonatori interni: Acad. Maya Simionescu și Dr. Alexandrina Burlacu.

OBJECTIVUL PROIECTULUI: să dezvolte o terapie celulară relevantă clinic pentru autoimunitatea diabetică prin livrarea de semnale apoptotice folosind celule stromale mezenchimale (CSM) ca vehicule.

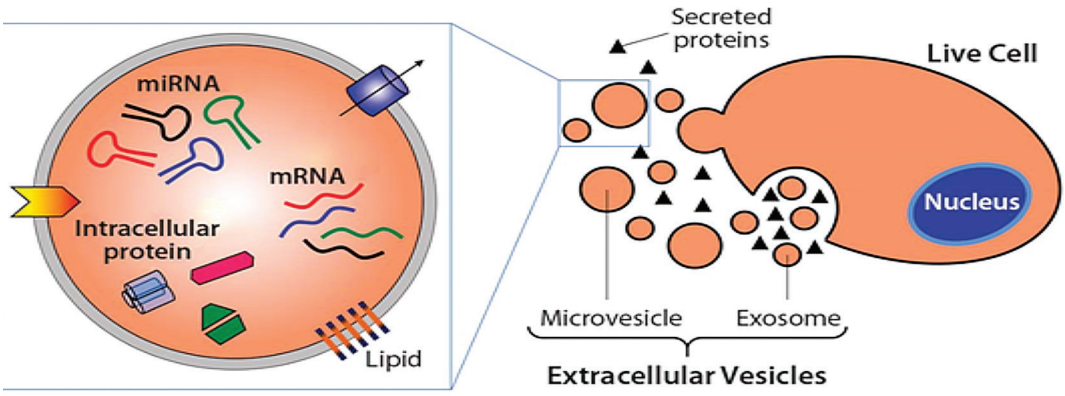


Proiect BIOVEA

-Proiect complex în care sunt implicate mai multe laboratoare din IBPC-NS-
Titlu: Dezvoltarea de bionanotehnologii bazate pe veziculele extracelulare, aplicabile in diagnosticul precoce, prognosticul si terapia bolii aterosclerotice

Coordonator Proiect: Dr. CSI Adriana Georgescu, IBPC N. Simionescu
PARTENERI: Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș" București (INCDVB) - Responsabil: Dr.CSI **Mihaela Gherghiceanu,** Universitatea de Medicina și Farmacie „Carol Davila" București (UMFCD) - Responsabil: **Prof. Dr. Dragoș Vinereanu;** Spitalul Clinic Județean de Urgență „Pius Brînzeu" Timișoara – Centru de cercetare OncoGen (OncoGen) - Responsabil: **Prof. Dr. Virgil Păunescu**

OBIECTIV GENERAL: Implementarea si dezvoltarea unor tehnologii emergente pentru identificarea derivatelor celulare polivalente, veziculele extracelulare, ce pot fi folosite in diagnosticul precoce, monitorizarea si terapia bolii coronariene stabile. Dezvoltarea tehnologiilor bazate pe veziculele extracelulare se afla inca in etapa pre-comerciala de inovare, iar implementarea si fundamentarea lor stiintifica pot sustine oportunitati relevante strategic in domeniul sanatatii.

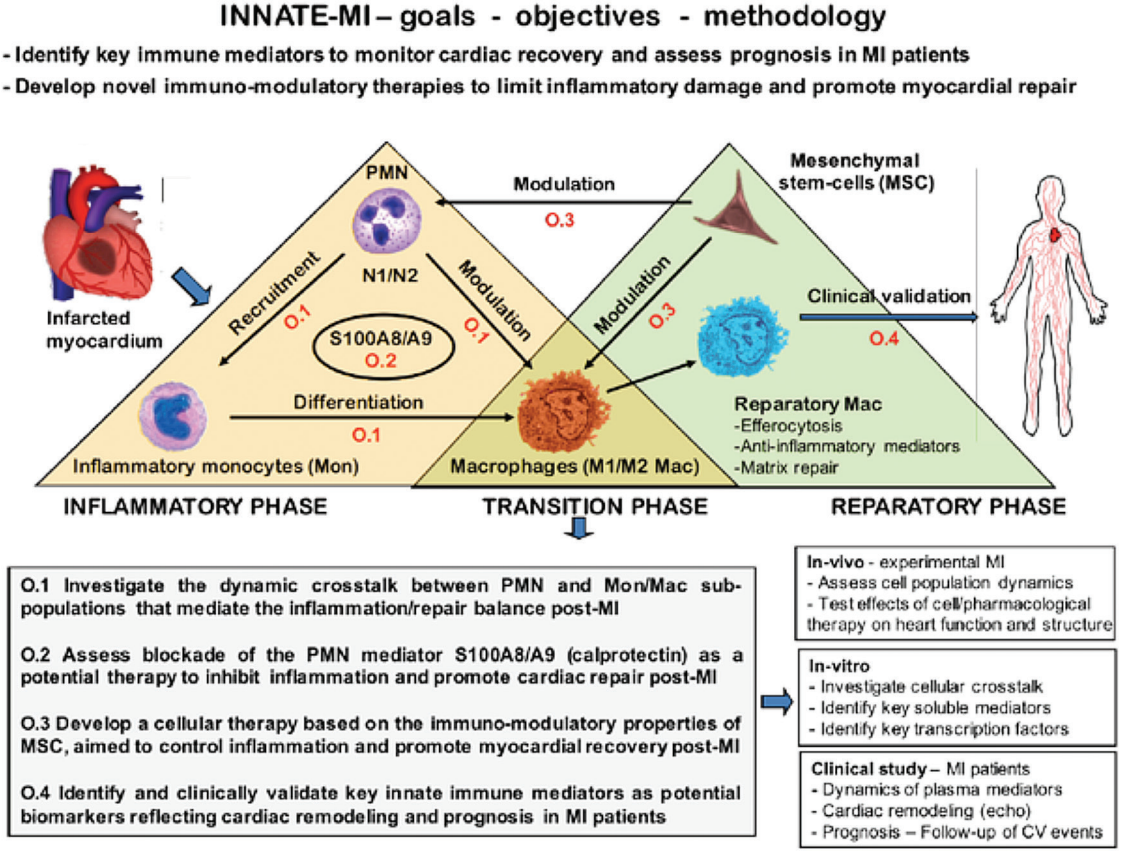


Proiect INNATE-MI

Titlul proiectului: Tintirea mecanismelor immunitatii innascute pentru o mai buna stratificare a riscului si identificarea de noi optiuni terapeutice in infarctul de miocard

Coordonator proiect: Acad. Maya Simionescu, Ph.D.,
ICBP "Nicolae Simionescu", Bucuresti;
Coordonator partener 1: Alexandru Schiopu, M.D., Ph.D., Universitatea de Medicina si Farmacie Targu Mures;
Coordonator partener 2: Prof. Dragos Vinereanu, M.D., Ph.D., Universitatea de Medicina si Farmacie "Carol Davila", Bucuresti.

SCOPUL ȘSI OBIECTIVELE proiectului sunt prezentate in figura de mai jos:



PROIECTUL INTERA

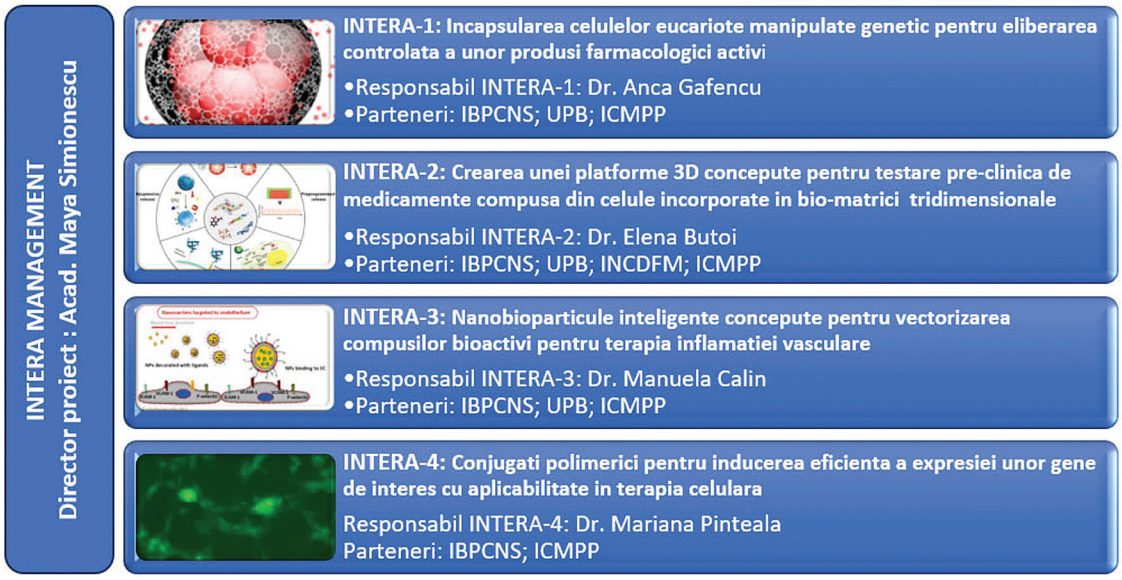
-Proiect complex în care sunt implicate mai multe laboratoare din IBPC-NS-

Titlu: Terapii inteligente pentru boli non-comunicabile, bazate pe eliberarea controlată de compuși farmacologici din celule încapsulate după manipulare genetică sau bionanoparticule vectorizate

COORDONATOR PROIECT: Acad. Maya Simionescu

PARTNERI: IBPC "N. Simionescu" (responsabil partener: **Dr. Anca Gafencu**), Universitatea Politehnică din București (responsabil partener: **Prof. Ecaterina Andronescu**), Institutul Național de Fizica Materialelor (responsabil partener: **Dr. Madalina Barsan**), Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" (partner responsible: **Dr. Gheorghe Fundueanu**).

OBIECTIV: Bolile cronice netransmisibile (ateroscleroza, diabetul, obezitatea, cancerul) reprezintă cauza majoră a mortalității în țările dezvoltate; toate implică un proces inflamator. Proiectul INTERA va asigura sprijinul necesar pentru consolidarea competențelor științifice și tehnice a unităților de cercetare partenere în proiect în domeniul Bioeconomiei, domeniu de importanță strategică pentru dezvoltarea economică și socială. INTERA include dezvoltarea de studii multidisciplinare care doar împreuna pot crea și defini noi nano- sau micro-dispozitive medicale utilizabile pentru terapii anti-inflamatoare inteligente și inovatoare.



2019 ICBP – NS is 40

Memories at 40 years

2019 IBPC – NS – la 40
Amintiri la 40 de ani

Prof. Alan Tartakoff
School of Medicine
Case Western Reserve University,
Cleveland, Ohio, SUA

Congratulations on the success of the Institute of Cellular Biology and Pathology !

I had the privilege to be a graduate student in George Palade's group at Rockefeller University when first Nicolae and then Maya came to town. From the perspective of a student, this was a magical couple, the Simionescus. Who were they ? They seemed immediately to be at home when they arrived in 1970's. Well-groomed, gracious, good-natured. Uniformly serious, analytic, recognizing the immense opportunity of being at the center of knowledge. Senior and intense in their awareness, but not sober or somber. And very hard-working !

Of course, George had been interested in the fundamentals of vesicular traffic in multiple contexts, as well as the structural correlates of capillary permeability. He and his associates already had good reason to think that passage of macromolecules across endothelia did not require opening of inter-cellular junctions. But with the arrival of Maya and Nicolae, these studies entered into a realm of certainty as well as unparalleled beauty. Their conceptually elegant experimental designs made use of multiple tracers to study endothelial permeability and microdomains of the plasmalemma. This was coupled with an exquisite sense of the value of ultrastructure and led to studies that were replete with micrographs so fine that they belong in a gallery. Indeed, the appreciation of the quality micrographs had reached the point that the corridors of the laboratory were lined with images of incomparable clarity.

Then came the energetic and taxing years following their return home, punctuated by repeated visits to the United States. The establishment of the ICBP and its maturation represented an unprecedented and courageous initiative. That Maya and Nicolae could have continued to be productive scientists under these circumstances is remarkable. The personal aspect of this vision and its realization, coupled with an appreciation of the reasonable and unreasonable challenges with which they had to deal, give a meaning to these forty years quite beyond any norm. In itself an experiment, this venture parallels in more ways than one the commitment that had originally inspired the development of the New York Cell Biology community.

In March of 1999, an extraordinary reunion took place in La Jolla. This was the first of the Symposia organized to honor George. It included talks by a sequence of intellectual inheritors of the traditions that he and his associates had established. Emphasis was on an integrative view of the structure/function relations of subcellular organelles. The mood was cheerful, reminiscent of the solidarity of purpose that had been characteristic of the Rockefeller group. The culminating event was, however, of a quite different variety. After dinner, Maya spoke at length. She evoked the joy of those times that she and Nicolae had spent in New York, the intense union that they had with Marilyn and George, the foundation experiences that evidently have led to the remarkable success of the Institute as it now flourishes in Bucharest.

Alas, that Nicolae cannot enjoy this moment today !

Angelo Azzi
Tufts University
Boston, USA

There are moments in time that modify the course of life. Turning points. One of those can be traced back in Grenoble in 1987at the FEBS-CNRS Course on Membrane Proteins. After the afternoon lectures some of the speakers went downtown to have a walk and a drink. I was walking side by side with George Palade when at a narrow place of the footway, before a curve, George kindly let me go first. Very kind of him indeed, but not very lucky for me, who banged onto two guys, one with a knife and the other with very fast hands that expertly subtracted my bag with passport, credit cards and all my money. And it was George to lend me few coins to call up my secretary. And it was with George that I was chatting in the evening and that he mentioned enthusiastically his great collaborators Maya and Nicolae Simionescu, first at the Rockefeller University and then at Yale University. Maya and Nicolae Simionescu had created a research institute of excellence in Romania, a few years before. One year later, in the spring of 1988, Federico Mayor Zaragoza, UNESCO Director General, in his office at Place de Fontenoy gave me the responsibility to launch the UNESCO-MCBN Program. MCBN, became a network of institutions of excellence, intended to strengthen scientific cooperation. And in the choice, the conversation with George Palade came back to my mind and the Institute created by the famous collaborators of George Palade was selected, the Institute of Cellular Biology and Pathology. The life and successful activities of MCBN lasted, as part of UNESCO till 2001 and as an independent NGO till 2008. But many of the MCBN Institutions have continued and are still valuable scientific assets of their countries. One of them is the Nicolae Simionescu Institute of Cellular Biology and Pathology, which despite political turbulences and financial restrictions has remained as a flagship in the Romanian scientific landscape. And this has happened due to the intelligence, scientific competence and strength of Maya Simionescu at the helm of the Institute after the passing of Nicolae. I have no certitude that my meeting with George Palade and the events that followed have been a turning point for the Nicolae Simionescu Institute of Cellular Biology and Pathology, but I like to think of the Institute as one that best represents the ideas of MCBN: *To ensure permanent improvement and one that is not entirely dependent on outside assistance, MCBN considered it essential that scientific-technical information and training as well as financial support be offered to students, scholars and laboratories in every region of the world where such help is useful."

At the end of this little story my gratitude goes to the late Nicolae and to Maya Simionescu for the creation of the Institute, to the late George Palade for making me aware of the existence of the Institute of Cellular Biology and Pathology, and finally to Maya Simionescu, for successfully leading the Nicolae Simionescu Institute of Cellular Biology and Pathology and for her invaluable friendship.

Prof. Pietro De Camilli

Howard Hughes Medical Institute

Recollections about the Simionescu's

Dear Maja, congratulations for the 40 years birthday of your Institute. I have fond memories of the time we spent together at Yale and much gratitude for what I have learned from you and Nicolae. You have been informal mentors to me. I vividly recall the early days of ICBP which I followed with great empathy from a distance. What you have achieved has been impressive and has been an inspiration for so many young people.

I am delighted to have an opportunity to say a few words about Maya and Nicolae Simionescu, whom I first met at Yale, when I was an assistant professor in the Section of Cell Biology in the late 1970's/early 1980's. At that time, they came to Yale every year to help teaching the Cell Biology course, a cornerstone of Yale Medical School education organized and directed by George Palade and Marilyn Farquhar. I shared with Maya and Nicolae the responsibility of teaching histology. Working with them was a most remarkable and educational experience for me. They set an impressive example of dedication, enthusiasm and competence. Everything had to be prepared and planned ahead of time in the best possible way. Nothing was left to improvisation. They took great pride in the quality of their teaching, and this attitude was passed down to young colleagues like me. Consistently, the students rated them as top teachers. Still now, when I meet doctors and scientists trained at Yale in those years, I find that they have the most wonderful recollections of Maya and Nicolae.

It was great to see them arriving every Fall at the beginning the teaching season and they were deeply missed when they left at the end of the course. They brought to us, used to work in the privileged environment of a top American institution, a refreshing different perspective. It was very clear that they were placing the best of their energies (and more) in building the new Institute in Bucharest. Their dedication to a "cause", that of creating an environment of science excellence in their own country, was inspiring. In fact, they influenced my choice to return to my own country (Italy) after a first period in the United States. I was lucky to be able to stay in touch with them for many years and it was always a joy to meet them somewhere in the world and to hear about their science and their Institute. When life brought me back to America at the end of the 1980's, I found once again their support. I may not be where I am now without them.

What Maya and Nicolae have achieved is truly remarkable. With their own research they have helped shaping modern vasculature cell biology. They have also helped shaping science in their own country and have created something outstanding in East Europe.

Prof. J. David Castle, PhD
University of
Virginia School of Medicine, USA

In 1979, the ICBP, Nicolae Simionescu emerged like the early rays of bright sunlight breaking through the dark and shadowed skies that were cast over the Romanian scientific endeavor in the preceding era. This marked a beginning in which world-class research on the cell biology and pathology of the cardiovascular system was conducted and disseminated from this new institute, which was the brainchild of Nicolae and Maya Simionescu. In the ensuing years, the ICBP has become the training ground for an entire generation of young and talented Romanian investigators, who have shared the Simionescu inspiration and passion for science and have proceeded to enrich the broader intellectual environment both at home and abroad. As well, the ICBP has served as a nidus for international collaborations and scientific exchange with investigators from all over the world. While it has become practically axiomatic that pushing the boundaries of new knowledge in biomedical research both further outward and deeper is a tireless and financially very challenging process, it is an extraordinary tribute to the ICBP and its scientists that over the period of forty years, such profound success has been achieved under conditions that many of the rest of us who share the same dreams and goals would have considered inconceivable.

Although more than forty years have passed, I remember so vividly the times that I spent in the early 1970s as a young trainee at the Rockefeller University and subsequently at Yale School of Medicine where I enjoyed a close friendship with Nicolae and Maya Simionescu and shared their love for cell biology. I recall so well the camaraderie that we shared when we all were doing experiments and having discussions often late into the night. But importantly, I also will never forget witnessing the step-by-step conceptualization of the ICBP as Nicolae and Maya pieced together their dream of a world-class research center in Bucharest floor-by-floor and room-by-room. Evidently, I did not fully appreciate the monumental task that they set for themselves. But now with the benefit of hindsight, the reality of what these pioneers have achieved in developing the physical plant and especially in creating a new and enduring scientific culture is impressive at the highest level.

As we look back over the lifetime of the ICBP, we can readily acknowledge how vitally it has served as an incubator for the development of young and talented Romanian research scientists. We can witness through their publications the numerous important contributions they have made in exploring the transendothelial passage of plasma lipoproteins and other critical vascular transport proteins. We can appreciate how their studies have shed new insight on key pathological events related to atherogenesis that are manifest at the endothelial surface, and we can admire the attention that is being given to evaluating potential clinical and translational connections. Importantly, it is also possible to sense the priority that is being given in the ICBP to incorporate the host of newer high-resolution technologies that have arisen over the past decade into its research portfolio. Now in the twilight of my own scientific career, I continue to be filled with excitement and envy as the pace of discovery moves to levels that were practically inconceivable only a few years ago. While I am facing the reality that future advances may not come from my own mind and hands, I will always continue to be an enthusiastic witness and champion for the next generation and their successes. In this spirit, I look forward with much anticipation to learning of the achievements of the emerging generation of pioneers at the ICBP. I consider it a great honor to contribute to the commemoration of the first forty years of the Institute and wish you all ongoing success at the highest level.

NYU Langone
MEDICAL CENTER
Department of Cell Biology

David D. Sabatini, MD, PhD
Frederick L. Ehrman Professor Emeritus
Department of Cell Biology

June 18, 2019

The Institute of Cellular Biology and Pathology
"Nicolae Simionescu"
8, B.P. Hasdeu Street,
050568, Bucharest, Romania
Attention: Acad. Maya Simionescu

Dear Maya,

Forgive me for the delay in answering your invitation to participate in the symposium and celebrations that will be held in Bucharest on occasion of the 40th Anniversary of the creation of the Romanian Institute of Cellular Biology and Pathology. I wish I had the physical vigor necessary to accept your invitation but at least you have prompted me to reflect on how fortunate I was to have met you and Nicolae and witness the launching of what turned out to be an impressive journey into modern biomedical research.

I first met Nicolae when he arrived at Rockefeller, on a day that Palade was not in the lab and I was Nicolae's guide for a short time. Later, of course, I also met you and through my conversations with the Simionescu's I became intrigued and somewhat fascinated by the physiological questions that motivated their research at the subcellular level. I must confess, however, that sometimes I could not help wondering if you could sustain that pace of research after returning to your country.

It was my privilege to attend the inaugural symposium in 1979 and to have been one of its speakers. Through the first 25 years of the Institute's existence, I followed with interest and admiration the pioneering contributions that you and Nicolae were making, first with George and then on your own, establishing and expanding our knowledge of the role of plasma membrane vesicles as mediators of transport across capillaries. It is indeed impressive how soon thereafter, in Bucharest, quite naturally you went beyond your initial concerns and developed an interest in vascular dysfunction, atherosclerosis and the complexities of the inflammatory process.

Now--forty years after the inauguration of the "Nicolae Simionescu" Institute--looking at your own, and at the Institute publications during the last quarter of a century, I am amazed at the diversity and importance of the basic and biomedical questions that are being tackled in your laboratories—which extend from advanced transcriptomics to specific molecular pathology quandaries, such as the mechanisms by which hormones stimulate the integration of human mesenchymal stem cells into heart tissue (published just last week).

In summary Maya, I am amazed and moved by the magnitude of what your vision, courage and drive have accomplished. This is reflected, of course, in the position that the Simionescu Institute has achieved within the European scientific scene.

I congratulate you warmly,

David

John Bergeron and Kathleen Dickson
McGillUniversity

Congratulations to the IBCP-NS and Maya Simionescu for their legacy of Excellence in Cell Biology

In 1970, the 5th floor of the South Lab of the Rockefeller University in Manhattan welcomed Nicolae and Maya Simionescu. They joined the lab of George Palade the overall director of the 5th floor "Laboratory of Cell Biology". At the time, this floor included Marilyn Farquhar, David Luck , Phil Siekevitz, David Sabatini, Jim Jamieson, Michael Moody and Jim Lake as well as Günter Blobel with the Nobel laureate, Arthur Kornberg doing a sabbatical and frequent visits by George Palade's previous mentor at The Rockefeller Albert Claude. The 6th floor of the South Lab was the domain of Sam Silverstein, Zanvil Cohn, James Hirsch as well as Ralph Steinman. The 7th floor of the South Lab had as its director Christian De Duve and included Henri Beaufay, Alain Amar Costesec, Brian Poole and Matthias Müller. Together, the investigators in these three floors transformed human knowledge through a new field they innovated known as "Cell Biology".

Maya and Nicolae Simionescu were key to this transformation with their unsurpassed work on the cell biology of the endothelium to define a new term in cell biology "transcytosis" through their studies of the endothelium in situ. They quickly resolved a raging controversy at the time as to how macromolecules were transported across endothelia by visualizing directly their transport quantitatively through a series of classical papers largely published in the Journal of Cell Biology. They discovered the role of the transcytosis vesicle that would ferry material through coupled endocytosis and exocytosis from one side of the endothelium to the other.

Their discoveries garnered for Maya and Nicolae the founding Louis and Arthur Lucian award from McGill University for their "outstanding research in circulatory diseases"in 1978. This was the first of a series of nationally and internationally prestigious awards including Member of the Royal Academy of Romania in 1991 and in 2013 "L'Ordre National de la Légion d'Honneur " conferred from France to the world's "first lady" of the endothelium, Maya Simionescu .

Looking back in 2019 to all that has transpired is astonishing and the legacy of Maya's directorship of the ICBP following from that of Nicolae remains inspiring to all fields of discovery research in all parts of the planet.

The Nobel Prizes to George Palade, Albert Claude, and Christian De Duve coincided with Maya and Nicolae's tenure at The Rockefeller then later at Yale with George Palade, Jim Jamieson, Marilyn Farquhar and Dave Castle. The Nobel prizes to Günter Blobel and more recently to Ralph Steinman gives a small sense of the revolutionary work that was initiated in the South Lab back in 1970. Of course, Gerry Edelman at the time had the first floor of the South Lab and he also was recognized with Nobel Prize for his work done at that time.

For Nobel Prizes, few are recognized but many are deserving. This includes all the colleagues on the 5th, 6th and 7th floors of the Rockefeller who have not yet been recognized, including Maya!

Sadly, several of the Nobel laureates have left us,

including George Palade, Christian De Duve, Albert Claude, Günter Blobel and Ralph Steinman as well as the more than deserving Jim Jamieson but their legacy is extended through the close family originally built in 1970 when Nicolae and Maya arrived.

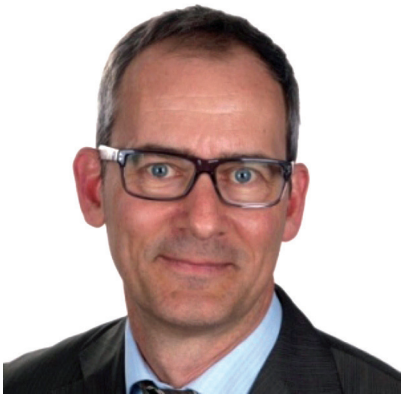
This family legacy was also built on the International Symposia of the IBCP beginning in 1979 featuring George Palade, Christian DeDuve, Günter Blobel, David Sabatini and Marilyn Farquhar with several since then.

Professor Gerd Bendas

University of Bonn, Germany

Congratulation to the 40th Anniversary of ICBP-NS from a German friend

Il had the pleasure to visit ICBP for the first time in 2007 on occasion of the 25th anniversary of the Romanian Society of Cell Biology in Bucharest. When I met Maya there, I understood the unique atmosphere of this efficient and successful Institute. I immediately got the impression that Maya is a person who is able to combine in a unique way her competences for excellence in science with a warm and kind spirit of collegiality under her respected guidance. I was more than happy to deepen these impressions in the time of our tight collaboration in terms of NANODIATER between 2011 and 2014. It was a great time to collaborate with all the kind colleagues from ICBP in this trans-European project on drug delivery of chemokine antagonists. The semiannual meetings in Bucharest were always a highlight that went far beyond a successful scientific exchange. During these meetings I realized how Maya and her colleagues as 'science-ladies' could bring together different person under the clear perspective and the horizon for scientific progress. Impressively to see was and is the obvious fact that the Institute has the spirit to permanently support younger scientists and to take care for their development. Our meetings



Felicitări pentru a 40-a aniversare a ICBP de la un prieten german

Gerd Bendas, Departamentul de Farmacie, Universitatea din Bonn, Germania

Am avut plăcerea să vizitez ICBP pentru prima dată în 2007, cu ocazia aniversării a 25 de ani de la infiinţarea Societăţii Române de Biologie Celulară, in Bucureşti. Când am întâlnit-o pe Maya acolo, am înţeles atmosfera unică a acestui Institut eficient şi de succes. Am avut imediat impresia că Maya este o persoană care este capabilă să îmbine într-un mod unic competenţele sale pentru excelenţa în ştiinţă cu un spirit cald şi amabil de colegialitate sub îndrumarea ei respectată. Am fost mai mult decât fericit să aprofundez aceste impresii în timpul strânsei noastre colaborări în ceea ce priveşte proiectul NANODIATER, între 2011 şi 2014. A fost un moment minunat să colaborăm cu toţi colegii amabili de la ICBP în acest proiect transeuropean privind livrarea de antagonişti de chemokine. Întâlnirile semestriale de la Bucureşti au avut întotdeauna ceva care a fost dincolo de un schimb ştiinţific de succes. În timpul acestor întâlniri, mi-am dat seama cum Maya şi colegii ei, în calitate de „doamne ale ştiinţei", puteau reuni diferite persoane sub perspectiva clară şi în orizontul progresului ştiinţific. Impresionant de văzut a fost şi este faptul evident că Institutul sprijinină permanent oamenii de ştiinţă mai tineri şi are grijă de dezvoltarea lor. Întâlnirile noastre s-au desfasurat

were covered and indicated by the kind atmosphere. Unforgettable for me was the start of the meetings after 6 month not having seen us by Maya's questions to everybody: "What has changed for you personally?" before coming to the scientific facts. This was always the sign of interest and respect to the others and friendship relations, and for sure, an important reason for the great success, and outstanding international reputation of ICBP.

All the best for you, Maya and Colleagues in and with the celebrating Institute.

într-o atmosfera amabilă. Pentru mine, de neuitat, a fost începutul întâlnirilor după 6 luni de când nu ne-am văzut prin întrebările Mayei către toată lumea: „Ce s-a schimbat pentru dumneavoastră personal?" înainte de a trece la datele științifice. Acesta a fost întotdeauna semnul interesului și al respectului față de ceilalți și al relațiilor de prietenie și, cu siguranță, un motiv important pentru succesul și renumele internațional de excepție al ICBP.

Tot ce este mai bun pentru tine, Maya și colegii din Institut

Dr. Anca Dobrian
Eastern Virginia Medical School, USA

Despre permanenta intelectuala a unei scoli

"Vreme trece, vreme vine"…..
Dupa 40 de ani vibranta intelectuala a scolii romanesti de biologie celulara metamorfozeaza in permanenta.
Este o ancora temporala pentru cei care au avut privilegiul sa navigheze apele stiintifice impreuna
Este un incubator prometeic pentru cei care isi pregatesc viitorul stiintific
Este amprenta unor generatii care au gindit, au sperat si au descoperit impreuna
Este un far virtual care calauzeste calatoriile indepartate ale celor care au plecat
Este un spatiu ospitalier pentru cei care se intorc acasa
Este o amintire din prezent
"Si-ntelegi din a lor arta ce e rau si ce e bine"…
Prospetimea amintirilor legate de intemeietorii scolii - dragii nostri profesori Maya si Nicolae Simionescu este intacta
––
Ei sunt vocile indemnului catre excelenta
Ei vegheaza celulele esentei noastre stiintifice
Ei exemplifica ardenta pentru descoperire
Ei sunt o amintire din prezent
Pentru scoala de biologie celulara romaneasca si pentru intemeietorii si elevii sai viitorul incepe in fiecare zi.
Anca Dobrian, Iulie 2019, Norfolk, USA

About the intellectual permanence of a school
"Days go past and days come still"……. "Vreme trece, vreme vine"
After 40 years of intellectual vibrancy, the Romanian school of cellular biology witnesses its metamorphosis into permanence
It is a temporal anchor for those of us who had the privilege to navigate the scientific waters together
It is a Promethean incubator for those who are crafting their scientific future
It is the footprint of a generation that thought, hoped and discovered together
It is a virtual lighthouse that guides the far away journeys of the ones that left
It is a hospitable space for the ones that return home
It is a memory from the present
"You will see behind their virtue what is right and what is ill"…. "Si-ntelegi din a lor arta ce e rau si ce e bine"
The freshness of memories about the founders of the school – our dear Professors Maya and Nicolae is intact
They will always be our scientific parents
They are the voices that prompt us towards excellence
They watch the cells of our scientific spirit
They exemplify the arduous path of discovery
They are a memory from the present
For the Romanian School of Cellular Biology and for their founders and scholars the future starts every day.

Anca Dobrian, July 2019, Norfolk, USA

Harvard Medical School Brigham and Women's Hospital

Michael A. Gimbrone, Jr., M.D.
Elsie T. Friedman Professor of Pathology

Director, Center for Excellence in Vascular Biology
Department of Pathology

August 21, 2019

Maya Simionescu, Ph.D.
Director and Co-Founder
Institute of Cellular Biology and Pathology
"Nicolae Simionescu"
Romanian Academy
Bucharest, Romania

My Dearest Maya,

This brief note is meant to convey my warmest personal greetings and congratulations on the momentous occasion of the 40th Anniversary of the founding of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", which you will soon be officially celebrating! The ICBP, now a designated Centre of Excellence of the European Community and a Member Institution of UNESCO-Molecular Cell Biology Network, stands as a beacon of academic research excellence internationally.

I am well familiar with the history of the ICBP whose origins trace to the days of your scientifically productive work with Nicolae, in the early 1970's, at the Rockefeller University in the laboratory of your mentor, fellow countryman, and future Nobel Laureate, Professor George Palade. Your role in the discover of trans-endothelial channels and their function in the exchange of macromolecules across the vascular endothelial barrier marked a seminal chapter in the then nascent field of Vascular Biology. Your return to Romania in the late 1970's (a difficult time in its political history) required remarkable dedication to your shared dream to introduce the modern science of Cell Biology to your homeland, and create a nurturing academic environment for the training of successive generations of young scientists.

In 1989, on the occasion of the 10th Anniversary of the ICBP, I had the opportunity to witness firsthand the fruits of your joint labors. In the company of your mentor, George Palade and my mentor, Ramzi Cotran, along with other thought-leaders in the world of Cell and Vascular Biology (including Samuel Silverstein, Morris Karnovsky, Russell Ross, Guido Majno and Isabelle Joris), we spent several days participating in a remarkable symposium and experiencing the genuine warmth of the ICBP community. It illustrated for me, still a relatively young 'journeyman' in the world of Vascular Biology, the extraordinary power of Science to transcend national political and cultural boundaries, and the manifest importance of sharing knowledge as part of an international, community effort to understand the workings of the human body and ultimately contribute to the alleviation of suffering from disease.

At this historically important juncture, I do hope that you and your colleagues will take the opportunity to reflect on the significance and impact of the scientific discoveries and accomplishments the ICBP has already enabled— and, looking forward, recommit to your original dream to "make a difference"!

With warmest best wishes for your continuing success,

Sincerely,

Michael

Dr. Felicia Antohe
"După 40 de ani, IBPC-NS 1979- 2019"

Sărbătorim anul acesta 40 de ani de la înființarea institutului nostru, « a căminului nostru », Institutul de Biologie și Patologie Celulară N. Simionescu. Acest institut este « copilul », creația materială și spirituală a Domnului Profesor Nicolae Simionescu și a Doamnei Maya Simionescu. Cu mult entuziasm, pasiune și tenacitate Dl. Profesor și Dna Maya au început proiectarea, construirea și dotarea acestei "aventuri științifice", pe care au reușit să o transforme în realitate în toamna anului 1979. Încă din primele zile s-au străduit să nu ne lipsească nimic ca să ne dezvoltăm și să câștigăm un loc de prestigiu în cercetarea biomedicală, așa cum adevărații părinți nu precupețesc niciun efort pentru educarea și creșterea copiilor.

Din păcate, de 24 ani, Domnul Profesor Nicolae Simionescu nu mai este printre noi, însă spiritul său novator, dăruirea sa pentru descifrarea tainelor biologiei celulare și moleculare sunt încă aici, în institut, le-a sădit în fiecare dintre noi cei care l-am cunoscut, și prin noi, în noile generații de tineri cercetători care au trecut sau vor mai trece prin aceste laboratoare. Prezența sa se face simțită la tot pasul, îl regăsim pe Domnul Profesor în lucrările și cărțile din bibliotecă, în protocoalele de lucru din laboratoare, în amintirile noastre reflectate în numeroasele fotografii din albumul institutului, în întreaga concepție de organizare a lucrului în institut și nu în ultimul rând în privirea pătrunzătoare și plină de forță cu care ne privește din portretul expus în Amfiteatrul G.E. Palade.

Fondatorii acestui institut ne-au obișnuit cu punctualitatea, cu munca perseverentă și exigentă, cu spiritul de echipă și colegialitate, cu disciplina dar și cu entuziasmul, optimismul, creativitatea și curiozitatea în munca de cercetare, una dintre cele mai nobile preocupări ale omenirii. Ne-au protejat în vremurile grele, în această oază a cercetării științifice, ne-au adus cu eforturi proprii hrana zilnică necesară unei astfel de activităţi : chimicalele, cărțile și revistele de specialitate necesare, prin GRANT-uri de la NIH USA, FIRCA, UNESCO, NATO,... dar și prin donații personale deloc de neglijat; ne-au pus în mână pipeta și ne-au dezvăluit lumea minunată a celulelor, ne-au dojenit aspru când am făcut greșeli și ne-au arătat hotărât drumul care trebuie urmat, ne-au încurajat în momentele grele de disperare când rezultatele se lăsau greu dezvăluite și nu în ultimul rând ne-au învățat să ne păstrăm sufletele tinere astfel încât toate obstacolele să fie mai ușor de trecut iar rezultatele și bucuriile noastre să le sărbătorim aici, împreună. Nu întâmplător la sărbătorirea a 10 ani de existență a IBPC, Domnul Profesor și Doamna Maya Simionescu au primit din partea tânărului institut "Diploma pentru cea mai GRANT-ioasă activitate" și un cristal șlefuit în multiple fațete, reflexie a neobositei străduanii umane și științifice desfășurate în institut. În aceste momente de sărbătoare să ne aducem aminte cu recunoștință de profesorii noștri, de domnul Profesor și D-na Maya, să nu le trădăm așteptările, să ne ridicăm la înalta exigență cu care ne-au învățat și să ne bucurăm împreună de succesele noastre alături de "părinții noștri profesionali", să rămânem mereu alături, mereu împreună.....

Este cunoscut faptul că cea mai bună metodă de educație este exemplul personal, așa au procedat și profesorii noștri, au fost primii care ne-au oferit exemplul de urmat. Unul dintre posterele prezentate la prima sesiune științifică a IBPC în 1980 era: "Transcitoza macromoleculelor prin endoteliul vascular". Colectivul de lucru s-a lărgit treptat și tema de cercetare propusă s-a dezvoltat generând un nou concept referitor la mecanismele de transport vezicular prin endoteliul vascular, concept preluat ulterior de comunitatea

internațională. Prin acest subiect de mare interes în cercetarea biomedicală se propunea studiul detaliat al mecanismelor de transport al macromoleculelor plasmatice prin endoteliul vascular către țesuturile subendoteliale. Experimentele efectuate sub îndrumarea Domnului Profesor și a Doamnei Maya Simionescu au evidenţiat implicarea veziculelor plasmalemale în transportul macromoleculelor prin endoteliul vascular, concept postulat inițial de Profesorul George Emil Palade în 1960. În următorii ani s-au acumulat noi date și în 1979 Profesorul Nicolae Simionescu a atribuit fenomenelor de transport vezicular transendotelial denumirea de "transcitoză". Rolul și funcția veziculelor plasmalemale în condiții normale și patologice (diabet, ateroscleroză,..) reprezintă și astăzi o temă de cercetare fundamentală prioritară în IBPC. Numeroasele experimente in vivo, în situ sau pe culturi de celule au condus la concluzia că veziculele plasmalemale sunt microdomenii membranare specializate. Ele au o compoziție lipidică unică și sunt lipsite de situsuri anionice puternice fiind implicate în procese majore de endocitoză și/sau transcitoză în celulele endoteliale. Acest lucru este susținut și de identificarea a numeroși receptori pentru macromoleculele plasmatice, cum sunt : LDL, HDL, Albumina, Albumina Glicată, Insulina..., și care au un rol foarte important în menținerea homeostaziei țesuturilor și a compartimentelor fluide din organism. Inspiraţia şi strategia cercetărilor coordonate printun plan bine gândit şi documentat a fost apreciat încă din 1983 de către Profesorul George E. Palade, la conferinţa "Workshop on the Cell Biology of the Vesel Wall": "... În momentul de față volumul cercetărilor pe endoteliul vascular este mai important în IBPC decât în laboratoarele Yale University, Medical School, USA… Transportul macromoleculelor mari sau mici e un domeniu de cercetare vast... În prezent acesta este un domeniu foarte activ de cercetare..".

Dupa numai doi ani de la acest eveniment cu prilejul celui de al patrulea simpozion internațional "The Forth US-Românian Workshop on Biomedical Reseach" în mai 1985, Profesorul Palade sublinia: " .. Americanii au fost plăcut surprinși să constate că în realitate ei au invățat mai mult de la cercetătorii români decât cercetătorii români de la ei. Asta nu se întâmplă deseori în lume. Se întâmplă rareori.... ".

C. Mineo și R.G.W. Anderson (în "Histochemical Cell Biology, 2001") citează faptul că grupul Simionescu a descris pentru prima dată canalele transendoteliale rezultate prin fuziunea mai multor vezicule implicate în transportul macromoleculelor. În aceeași lucrare sunt menționate alte două rezultate notabile ale grupului (din 1983 și 1989), demonstrând prin autoradiografie transportul transendotelial al tiroxinei și prin tehnica de înghețare –fracturare formarea complexelor filipină-cholesterol cu rol stabilizator, localizate la deschidera veziculelor plasmalemale către frontul luminal sau abluminal.

Astăzi, alături de Dna Maya, în acelaşi spirit de cercetare febrilă în lumea fantastică a celulelor, noi date sunt evidenţiate prin analize proteomice bazate pe spectrometrie de masă şi bioinformatică de înaltă performanţă pentru identificarea biomarkerilor în bolile cronice (arteroscleroza, diabet, cancer,..). Rezultatele sunt încurajatoare, şi suntem încrezatori că eforturile noastre vor fi răsplătite contribuind astfel la dezvoltarea "medicinii de precizie" prin transferul şi utilizarea rapidă a biomarkerilor pentru diagnostic şi tratament personalizat.

Exemplificările ar putea continua însă din păcate, nu putem să menționăm toate rezultatele recunoscute international (peste 6000 de citări in ISI-Web of Science în 2019 şi Hirsh index=50) în lucrărilor grupului Simionescu. Un alt prieten drag al institutului, Profesorul Guido Majno, spunea : "The endothelium used to be a barrier... Let it now be …a link! Transcytosis IBPC-USA" sau altfel spus cercetarea nu are frontiere și transferul de informație și cunoștințe trebuie să reprezinte un bun al întregii omeniri. Noi ne angajăm să respectăm acest crez și să-l transmitem generațiilor viitoare.

Septembrie 2019,

Dr. Adriana Georgescu
IBPC „Nicolae Simionescu”

După douăzeci şi trei de ani Gânduri printre rânduri

Puţine sunt momentele în care mai găsim timpul de a privi retrospectiv. Pentru cineva complet ancorat în prezent timpul se scurge din ce în ce mai repede, poate şi pentru faptul că evoluţia noastră este continuă. Există şi momente în care ne dorim să medităm, să cunoaştem şi să ne cunoaştem mai bine, să procesăm şi să integrăm informaţiile şi întâmplările din viaţa noastră pentru a înţelege şi a ne înţelege mai bine.

Într-un astfel de moment mă aflu acum, şi privind în urmă cu douăzeci şi trei de ani îmi amintesc prima zi a venirii mele în Institutul de Biologie şi Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" (Institutul Nostru). Era iarnă, prin luna februarie, eram încă studentă la Master, mă gândeam la un viitor necunoscut, speram şi îmi doream cu ardoare să fac performanta într-un domeniu apropiat pregătirii mele universitare. În urma unui interviu riguros, dar în acelaşi timp apropiat şi natural cu Doamna Academician Maya Simionescu (Doamna Maya, aşa cum ne adresăm cu toţii), mi s-a oferit şansa de a mă integra în colectivul Institutului Nostru şi de a mă dedica cercetării ştiinţifice.

Încă de la început am fost repartizată în Departamentul de Disfuncţii Vasculare în Diabet (astăzi cu denumirea Departamentul de Patofiziologie şi Farmacologie) coordonat de doamna Dr. Doina Popov (Doamna Doina). În timp am înţeles că acest moment din viaţa mea nu a fost întâmplător, ci a fost clipa în care s-a trasat viitorul carierei mele ştiinţifice. Dar aveam în faţă un drum lung, cu multă muncă şi multe lecţii de învăţat din el. A urmat perioada doctoratului şi a examenelor de promovare, descoperind în acest fel complexitatea activităţii de cercetare. Am învăţat în tot acest timp să apreciez cercetarea ştiinţifică şi oamenii care se dedica ei, să înţeleg valoarea adevărului ştiinţific şi importanţa muncii în echipă, să comunic ideile şi rezultatele ştiinţifice. Am învăţat că cercetarea înseamnă multă muncă, seriozitate, perseverenţă, pasiune, echilibru, gândire profundă, dar şi renunţări la multe alte lucruri. În timp am realizat că pentru a trăi bucuria succesului trebuie să cunoşti şi amărăciunea eşecului - mă gândesc aici la lupta permanentă pentru publicaţii ştiinţifice şi grant-uri pentru cercetare. Cu timpul am înţeles însă că pentru a evolua pe plan profesional sunt importanţi atât oamenii din jurul nostru cât şi locul în care ne desfăşurăm activitatea. În Institutul Nostru, acest cadru al ştiinţei, propice dezvoltării armonioase a unui cercetător, a fost creat, menţinut şi dezvoltat timp de 40 de ani de două personalităţi marcante ale vieţii ştiinţifice din România, Profesorii Maya şi Nicolae Simionescu, cărora le port un respect deosebit, îi admir şi preţuiesc deopotrivă. Am regrete profunde ca nu am avut şansa de al cunoaşte îndeaproape şi pe Profesorul Nicolae Simionescu.

Dar, odată cu trecerea timpului, am învăţat să cred cu tărie că fiecare lucru care se întâmplă are un sens, îşi are rădăcina în ceva mai adânc decât viaţa de la suprafaţă, te ajută să te formezi, să evoluezi, să îţi defineşti personalitatea, să descoperi în cele din urmă formula unui echilibru perfect.

Dr. Manuela Călin
IBPC „Nicolae Simionescu”

Amintiri dragi din viața mea în ICBP-NS -Gânduri pentru cea de-a 40-a Aniversare a ICBP-NS-

În anul 1996 eram studenta la master, la specializarea Biofizică din cadrul Facultăăii de Fizică din Măgurele și am dat concurs pentru ocuparea unui post de asistent de cercetare stagiar în cadrul IBPC. Mărturisesc, că atunci când m-am prezentat la concurs, nu știam mare lucru despre acest institut. Ce stiam, era ca vroiam să am o cariera în cercetare, vroiam să fac un doctorat în ţara sau în străinatate. Și am fost norocoasă… După un interviu preliminar cu Doamna Dr. Felicia Antohe, am fost programată la interviu cu Doamna Acad. Maya Simionescu. Am ajuns în Institut și am întalnit-o pe Doamna Maya chiar în holul institutului unde vorbea foarte apropiat cu niște colege (mai târziu am înţeles de ce toata lumea îi spunea simplu, “Doamna Maya”), și am intrat in biroul Dânsei pentru interviu. Am fost foarte impresionată din prima clipă de personalitatea Dumneaei și de căldura cu care înconjura tinerii. Din pacate, am ajuns în Institut la un an dupa dispariția prematură a Domnului Acad. Nicolae Simionescu, “Domnul Profesor “cum îi spuneau cu respect toți cei care povesteau despre dânsul. Am regretul că nu am avut șansa să întalnesc o asemenea personalitate, dar simt că spiritul dânsului este prezent peste tot in Institut.

M-am bucurat că am fost selectata și că mi s-a oferit șansa să lucrez în institut și mai ales, să fac parte din aceasta familie IBPC, unde am învațat că pentru a obţine rezultate ştiinţifice este nevoie de răbdare, perseverenţă, multă muncă si de asemenea, am învațat să apreciez relațiile interumane și am inteles cât de importante sunt rădăcinile pentru ca ramurile tinere să-și tragă seva și să se poata dezvolta.

Am început sa descopar rolul pe care soții Simionescu l-au avut în dezvoltarea biologiei celulare în Romania și în lume. Am aflat despre aprecierea deosebită de care se bucurau în SUA, unde au fost mulți ani la rând invitați să-și pună in practică ideile de cercetare și să predea la Universități prestigioase (Rockefeller, Yale si Columbia) și unde au proiectat Institutul IBPC care avea să funcționeze după modelul celor din SUA. Am înțeles eforturile depuse de ei pentru realizarea acestui așezământ de ştiinţă şi cultură în timpul comunismului. Apreciez foarte mult și sunt recunoscatoare pentru tot ce au reușit sa înfăptuiasca, pentru toata dăruirea, munca și încăpățânarea de a pune în practica un vis, acela de crea un Institut din temelii și de a concepe cu inteligență si inspirație un program de cercetare ştiinţifică la nivelul celor din "afară". Am apreciat, de asemenea, lupta pe care au dus-o sa obțină fonduri de cercetare de la NIH pentru ca tinerii cercetători din Romania să poata să-și dezvolte ideile și să poata face cercetare la nivel mondial.

Încet, încet povestea Institutului a devenit și povestea mea... Lucrez, de fapt, trăiesc aici (pentru că Institutul este pentru mine a doua casă) de 23 de ani și pot sa spun că sunt produsul acestui Institut și că Doamna Maya a avut un rol major in formarea mea ca cercetator și ca om. A fost un model pentru mine, mi-a insuflat interesul și dragostea pentru biologia celulară și de la Dânsa am invatat ca pentru a obține rezultate ştiinţifice valoroase este nevoie nu numai de idei bune, dar și de multă muncă, dăruire, răbdare și perseverență. Am învățat cum să comunic ideile și rezultatele într-o prezentare sau o lucrare ştiinţifică și, poate lucrul cel mai de pret, am înţeles cât de importante sunt personalitățile cu care avem șansa

să ne întalnim în viață pentru a ne putea dezvolta și defini ca oameni și ca cercetatori.

A fost un adevarat privilegiu pentru mine să beneficiez de coordonarea Doamnei Maya în realizarea tezei de doctorat și să mă bucur de tot sprijinul pentru a dezvolta o direcție nouă de cercetare în Institut pentru terapia bolilor cardiovasculare bazată pe nanocărăușisi capabili să transporte medicamentul încorporat la placa aterosclerotică pentru realizarea unui tratament țintit.

Am petrecut nenumărate momente minunate împreună cu colegii la zilele de sărbătoare ale Institutului, la petrecerile aniversare sau la petrecerea traditională de anul nou organizată de Doamna Maya "Chez Simionescu".

Trebuie să marturisesc că simt o mare mândrie când spun că lucrez la IBPC "N. Simionescu", pentru că este un nume care are rezonanța în lumea ştiinţifică și care și-a câstigat respectul datorită contribuției aduse la dezvoltarea biologiei și patologiei sistemului cardiovascular.

Sper ca eu și colegii mei mai tineri să ne aflam la înălțimea mentorilor noștri și să contribuim și noi, în continuare, la prestigiul Institutului.

La Mulți Ani, IBPC-NS!

Dr. Irina Titorenco
IBPC „Nicolae Simionescu”

“Trecutul este doar începutul unui început.”
H.G. Wells

Se spune că amintirile sunt întotdeauna un loc de întâlnire cu mici crâmpeie din sufletul nostru. Păşesc acum către o astfel de întrevedere şi încerc să relatez despre începuturile mele în lumea ştiinţei.

Plină de entuziasm dar şi revoltător de naivă m-am prezentat după terminarea Facultăţii de Biologie la un interviu de angajare în IBPC. Am aflat astfel încă de la început cât de greu este să pătrunzi într-o instituţie în care ştiinţa este produsă şi promovată în cel mai serios mod. După un riguros interviu cu D-na Dr. Doina Popov am avut prilejul de a o cunoaşte pe D-na Acad. Maya Simionescu. Am fost deosebit de emoţionată de întâlnirea cu D-na Maya care m-a impresionat cu blândeţea şi naturaleţea dânsei. Îmi amintesc de ochii albaştri pătrunzători deosebiţi de frumoşi care parcă îmi citeau toate gândurile şi intuiau toate speranţele mele. În urma acestui interviu întreaga mea viaţă s-a schimbat. Am fost repartizată de către d-na Maya în Laboratorul de Culturi Celulare unde şeful laboratorului era Dl Dr. Victor Jinga. Încă din prima mea zi în această instituţie am avut şansa de a-mi cunoaşte toţi colegii deoarece era ziua de naştere a D-nei Manolescu şi surprinsă am constatat că întreg institutul sărbătorea acest eveniment. Trebuie însă să mărturisesc că nu ştiam în ce colţişor mai îndepărtat să mă ascund deoarece toată lumea era curioasă să mă întâlnească. Îmi amintesc atmosfera caldă şi familială cu care m-au întâmpinat colegii şi timid am început să interacţionez şi eu cu ei. Timid am făcut şi primii paşi în lumea fascinantă a celulelor. Eram foarte stresată că nu voi putea niciodată să reţin atât de multe amănunte despre cultivarea celulelor. Numele mediilor de cultură mi se păreau ceva de domeniul fantasticului şi mă îngrijoram că nu o să ştiu niciodată ce mediu de cultură va fi potrivit pentru cultivarea fiecărui tip celular. Încet, cu multă răbdare, pasiune şi toleranţă am reuşit să descifrez multe dintre tainele din lumea celulelor. Recunosc că nu a fost un drum uşor şi că şi într-o familie am avut uneori şi mici divergenţe. Disputele ştiinţifice cele mai dese au fost cu Dl Dr. Victor Jinga, coordonatorul Laboratorului, un om deosebit, foarte corect, strict în privinţa lucrului în laborator însă şi mai strict în privinţa lucrului în aria sterilă. Severitatea şi meticulozitatea dânsului în gestionarea oricăror probleme apărute, precum şi înţelegerea şi prietenia cu care ne întâmpina atunci când aveam nevoie, mi-au fost lecţii definitorii în şlefuirea personalităţii mele.

Realizez acum, după 19 ani, că ceea ce ne leagă pe toţi este ceea ce am primit de la fondatorii acestui institut: pasiunea pentru necunoscut, dragostea pentru semeni şi binele lor precum şi iubirea pentru tot ceea ce înseamnă frumos. Încerc să menţin aceste valori şi să le predau şi eu mai departe tinerilor mei colegi. De-a lungul acestor ani am aflat că pentru a-ţi îndeplini un vis şi a-ţi croi un drum în viaţă, într-adevăr “imposibilul nu există”!

La mulţi ani IBPC!

Florin si Cristina Lupu

Oklahoma City, USA

Atât mie cât și Cristinei, ne face deosebită plăcere și onoare să scriem câteva rânduri în cartea dedicată aniversării a 40 de ani de la înființarea institutului în care ne-am început cariera în cercetare. Eu am avut norocul să particip la simpozionul inaugural din 3 septembrie 1979. Fusesem angajat doar de trei zile, dar venisem cu o săptămână înainte să ajut la vopsirea ușilor și ferestrelor în pregătirea deschiderii oficiale. Simpozionul inaugural la care participau titanii cercetării științifice, și în particular ai biologiei celulare, Palade, de Duve, Blobel, Sabatini, Farquhar și Franke a fost un moment memorabil pentru mine și probabil primul contact al României cu cercetarea cea mai avansată de biologie celulară.

Timp de 12 ani, institutul a fost in centrul vieții noaste. Petreceam în institut 14-16 ore pe zi și uneori și nopțile… Cum la început nu aveam buletin de București și nu puteam primi locuință în oraș, institutul mi-a fost și casă în primii doi ani. Intram în institut luni dimineața și ieșeam sâmbătă seara. Lucram pâna seara târziu și noaptea dormeam pe o canapea în laboratorul de radioautografie, ce nu era încă pus în funcțiune. Colegii veneau seara și mă rugau să le urmăresc electroforezele, să schimb soluțiile sau să le trec probele de țesuturi în epon. Îmi amintesc de o nopte petrecută în camera rece, colectând probe de la coloana Elizei; lăsase în grija mea colectorul de fracții care s-a stricat peste noapte și a trebuit să colectez probele manual la fiecare 5 minute… Era "fun"… eram tineri, plini de energie și nimic altceva nu conta… Acum privim în urmă cu nostalgie și bucurie. Dacă au fost și zile grele, le-am uitat de mult…

Anii petrecuți în IBPC au avut o influență imensă asupra formării noastre atât din punct de vedere profesional cât și, mai ales, ca oameni. Am avut norocul să avem doi mentori excepționali în profesorii Nicolae și Maya Simionescu care ne-au învățat cum să gândim un experiment, să scriem o lucrare, să facem un poster ori să prezentăm rezultatele în fața unei audiențe. De asemenea, ei ne-au ocrotit de grijile, frământările și greutățile anilor '80. Deși ultimii ani ai acelui deceniu au fost cei mai grei, institutul era o insulă de liniște și siguranță într-o mare de haos.

Dl. Profesor și D-na Maya ne-au învățat și cum să ne bucurăm de anii frumoși ai tinereții, să fim creativi, să ne distrăm și să petrecem, să ne păstrăm optimismul chiar și în cele mai dificile situații și să formăm prietenii care dăinuiesc și astăzi.

Deși suntem plecați de peste 25 de ani, noi am rămas cu sufletul alături de institut și am căutat să-l vizităm ori de câte ori trecem prin țară.

Folosim și această ocazie să ne exprimăm mulțumirile, recunoștința si admirația noastră pentru mentorii noștri și să felicităm foștii noștri colegi și noile generații de cercetători care au dus mai departe și au înzecit succesele începutului.

La Mulți Ani IBPC-NS !

Dr. Violeta Trușcă
IBPC "N. Simionescu"

Gânduri ale unui tânăr entuziast adresate cu ocazia aniversării IBPC „Nicolae Simionescu"
(în semn de recunoștință pentru șansa de a lucra în institut)

Încă din timpul liceului (secția Chimie-Biologie) și a Facultății (Biologie, Secția Biochimie) mi-am dorit să lucrez intr-un loc special, care să-mi satisfacă în primul rând nevoia de cunoaștere. Unii mi-au spus: "Ai grijă ce-ti dorești, pentru că ți se îndeplinește!" Într-un final, mi-am dat seama că am primit mai mult decât mi-am dorit! Deși n-am venit de foarte mult timp în institut, pot spune ca "am crescut" in institut: când am obținut postul de asistent de cercetare aveam 23 de ani, acum am 35. N-am fost încă de la înființarea institutului (aș fi vrut eu, dar atunci nici nu eram născută), însă nu trebuie să fii neapărat de la început ca să te poți atașa și prelua acest "virus al pasiunii pentru cercetare", cum îi place să-l numească doamna Acad. Maya Simionescu. În 2006, imediat după ce m-am înscris la Masterul de „Biologie și Biochimie Moleculară", am participat la o școală post-universitară organizată în IBPC „Nicolae Simionescu". Cu această ocazie, m-am bucurat să aflu ce lucrau cercetătorii din cele șapte laboratoare existente atunci, despre care știam doar câteva lucruri de pe site-ul institutului. M-a impresionat profesionalismul prezentărilor celor din institut, cât și al invitaților din străinătate. În mod special, mi-au atras atenția prezentările susținute de Dr. Anca Gafencu și Dr. Manuela Călin. Mi-am dat seama că eram atrasă de biologia moleculară și că îmi doream ca într-o bună zi să prezint și eu propriile rezultate cu aceeași eleganță și profesionalism. Când privești lucrurile "din afară", așa cum le priveam eu înainte să ajung in institut..."par extraordinare", însă când le privești "de aproape" începi "să le înțelegi și să iți placă"... ceea ce contează cel mai mult. In cercetare sunt multe lucruri interesante, iar uneori este nevoie doar să știi să le privești și să le înțelegi. La scurt timp după ce am început să lucrez sub îndrumarea doamnei Dr. Anca Gafencu, aceasta m-a întrebat "dacă îmi place". Deși am fost surprinsă de întrebare, am răspuns imediat afirmativ. Apoi am aflat că "A face ceea ce-ți place" este o condiție obligatorie pentru a reuși. Mai târziu mi-am dat seama că: "Da, îmi place mai mult decât mi-am închipuit vreodată!" De când am aflat ce lucruri captivante sunt studiate în institut, mi-am dorit să fiu mai aproape de acesta și consider că la un moment dat s-a și întâmplat…și la propriu și la figurat. În institut am învățat multe lucruri și sunt convinsă că am preluat câte puțin de la fiecare cercetător cu care am interacționat, încercând pe cât posibil să preiau doar ce e bun. Sunt convinsă că „micromediul" existent în institut m-a influențat in bine, direct sau indirect. Cred că tinerii entuziaști din institut reprezintă un fel de "diamant nețlefuit" și e nevoie de cineva care să-i descopere și să-i facă să strălucească! Contează mult să ai exemple cu adevărat demne de urmat, ca doamna Acad. Maya Simionescu. Mă bucur tare mult că eu am avut privilegiul să o am pe dânsa drept conducător de doctorat. Îi sunt recunoscătoare că m-a primit in această "Casă a Științei" și mi-a dat șansa să lucrez în institut alături de oameni deosebiți. Încerc (cât pot eu de mult) să o folosesc! De la doamna Acad. Maya Simionescu am înțeles că atunci când sunt multe persoane apropiate, bucuria nu se împarte ci se amplifică, așa cum se întâmplă și în familie. Mă bucur că fac parte din această "mare familie a IBPC", așa cum o numește dânsa.
Mulțumesc.

Dr. Sanda Burlacu
IBPC "N. Simionescu"

IBPC-40 - Amintiri nostalgice la zi aniversară

În urmă cu 22 de ani, foarte proaspătă absolventă a Facultății de Biologie, Secția Biochimie, păşeam timidă pragul Institutului de Biologie şi Patologie Celulară "Nicolae Simionescu", în căutarea unui loc de muncă. Am trecut printr-o serie de interviuri, în urma cărora am fost selectată în familia "culturiştilor", adică în laboratorul de Culturi Celulare, condus de Dl. Dr. Victor Jinga.

Încă de la început am format legături strânse de prietenie cu colegii din institut, din care unele rezistă şi astăzi. Îmi amintesc cu mare plăcere că a fost o lungă

perioadă de timp în care, din când în când, ne reuneam seara, la finalul unei zile de experimente, un grup de colegi şi, prin rotatie, câte unul dintre noi pregătea cina pentru toți ceilalți. Uneori ni se alătura şi Dna Maya, ceea ce dădea oarecare solemnitate acestor întruniri. Poate părea un detaliu trivial al primilor ani petrecuți în institut, insă cu siguranță acesta a contribuit foarte mult la perceperea institutului şi a colectivului ca a doua mare familie.

A fost şansa vieții mele ca primul loc de muncă să fie în cadrul unui prestigios institut de cercetare românesc, chiar dacă la vremea respectivă eram doar în căutarea unui "loc de muncă". Am realizat la puțin timp după angajare acest lucru şi am încercat să fiu la nivelul cerut de standardele interne.

Fiecare discuție cu dna Maya mă motiva suplimentar şi mă dedicam aproape total muncii mele. Petreceam timp peste program în institut şi mare parte din orele petrecute acasă citeam literatura de specialitate. O făceam cu curiozitate şi plăcere, era o joacă permanentă, noul meu mod de a fi, copiat după modelul fondatorilor acestui institut.

Activitatea din institut a devenit în scurt timp foarte importantă pentru mine. Fiecare experiment nereuşit îmi producea aşa o mare tristete, încât fiica mea, pe vremea aceea pre-şcolar, a ajuns să-şi dorească reuşitele mele profesionale la fel de mult ca timpul fizic petrecut alături de mama ei.

Pasiunea pentru cercetare s-a consolidat în timp, probabil datorită domeniului de cercetare pe care l-am abordat, dar şi al mediului profesional şi colegial pe care l-am întalnit aici. Astăzi, acest institut este încă a doua familie pentru mine.

Şi acest lucru mă determină sa vin în fiecare zi cu aceeaşi plăcere la serviciu.

Dr. Anca Gafencu
IBPC „Nicolae Simionescu”

Un sfert de veac în familia IBPC!

Uşa Institutului s-a deschis pentru mine acum 25 de ani. A doua zi după examenul de licenţă plecasem de acasă cu gândul să-mi depun CV-uri pentru angajare la toate institutele din jurul Facultaţii de Biologie. Am depus mai întâi la IBPC, însă o ploaie de vară m-a împiedicat să mai depun şi la celelalte institute! După prima etapă de selecţie, am avut un interviu cu Profesorul Simionescu. În dimineaţa zilei de 1 august 1994 am sosit la institut, iar la intrare am întâlnit-o pe Luminiţa Rădulescu, care fusese şi ea primită în rândul IBPC-iştilor. Din păcate, eu şi Luminiţa am fost ultimele cercetătoare angajate de Profesor…

După o perioadă de acomodare în institut, doamna Dr. Maya Simionescu ne-a chemat şi ne-a repartizat în laboratorul doamnei Dr. Ina Heltianu. Eu urma să lucrez cu doamna dr. Ina Heltianu iar Luminiţa cu doamna Dr. Felicia Antohe. Mai târziu am aflat că s-a dat cu banul, pentru ca repartiţia noastră între cele două şefe să fie total aleatorie. Nu ştiu dacă pentru mine a fost cap sau pajură, ştiu însă că doamna Ina mi-a arătat primii paşi în lumea fascinantă a cercetării, mi-a fost şi îndrumător în laborator pe toată perioada stagiului meu de doctorat şi m-a molipsit cu entuziasmul şi pasiunea pentru această meserie. Pe perioada doctoratului am avut şansa de a fi în echipa de proiect a unui grant colaborativ Romania-Elvetia, câstigat de doamna Maya şi de Prof. Walter Hunziker (Universitatea din Lausanne). A fost o experienta fructoasă, în care am învăţat din tainele Biologiei Moleculare, ceva foarte modern în acea vreme, iar pentru mine, ceva fascinant. In 2004, mi-am susţinut teza de doctorat. Eram foarte mândră de realizare!

Ca și cum ar fi fost o continuare, am fost apoi introdusă de către doamna Maya în echipa unui alt proiect colaborativ finanţat de NATO Science, proiect iniţiat de Prof. Vassilis Zannis (Universitatea din Boston). Avand un interes deosebit pentru tot ce se petrece în nucleul celulelor, am început colaborarea cu Prof. Dimitris Kardassis de la Universitatea din Creta şi totodata iniţierea în reglarea genică şi semnalizarea intracelulară, procese care m-au atras dintotdeauna. Semnalizarea intracelulara poate fi privită ca un joc de billiard, cel care manipulează tacul având un rol decisiv, însa şi aranjarea bilelor/moleculelor fiind foarte importantă!

De-a lungul anilor, am participat la diferite competiţii pentru obţinerea finanţării pentru proiectele de cercetare. Acceptul unui proiect este o bucurie imensă! În ultimii ani, proiectul Diabeter, a fost şi este o provocare, însă cât de mult am învăţat! Cercetarea este o căutare continuă, iar răspunsul, în mod surprinzator, poate aduce mai multe întrebări!

Pe lângă cercetare, am mai participat şi la două proiecte de suflet, două proiecte suport, finantate de Comunitatea Europeană. Primul, obţinerea titlului de Centru de Excelenţă Centru de Excelenţă şi totodată a unui grant de mobilitate acordat de Comunitatea Europeană prin Programul Cadru 5. Alături de doamna Maya am participat atât la realizarea aplicaţiei cât şi la managementul proiectului. Nu pot să uit că, în ciuda faptului că mulţi alţi cercetători de la alte institute renunţau pe parcurs, doamna Maya nu putea fi oprită din muncă şi nimic nu a putut opri realizarea proiectului nostru. În anul 2000, Institutul a fost ales ca Centru de Excelenţă al Comunităţii Europene, spre bucuria tuturor, dar parcă mai mare, a mea! Al doilea proiect suport, SERA, a fost unul de succes şi majoritatea cercetătorilor din institut au putut beneficia de stagii de specializare în laboratoare din străinătate sau au participat la diferite manifestări ştiinţifice în perioada 2005-2008. Am atâtea amintiri din acea perioadă!

Câtă bucurie de a-i întalni pe cei pe care îi credeam ascunşi în laboratoarele lor şi câtă plăcere să constat că

şi ei au căutări, dubii, inerente eşecuri, dar şi bucuria descoperirilor! De asemenea, am înţeles că cercetarea nu mai poate fi facută independent, colaborările aducând multe beneficii, accelerând obţinerea rezultatelor şi dezvoltând orizontul cunoaşterii.

De-a lungul celor douăzeci si cinci de ani, fiecare doctorat a fost privit ca un majorat pentru cercetatorul respectiv. Câtă bucurie pentru obţinerea titlului, dar

câtă responsabilitate urmează acestuia… Imi aduc atat de bine aminte de doctoratul Sandei, Manuelei, Elenei, Irinei! Am crescut împreună, dar fiecare şi-a urmat propria cale si şi- a făcut grupul ei de cercetare, totul sub umbrela IBPC şi sub ochii atenţi ai doamnei Maya!

În 2009, proiectul CARDIOPRO i-a adus institutului o nouă "haină" (structură şi aparatură), îmbogaţită apoi şi prin proiectul SORTIS. În acelaşi timp, a apărut şi Vera. Nu mi-am imaginat atunci că se va crea grupul copiilor existent acum: Ana, Maria, Vera, Rareş, Ştefania, Tudor şi "sulioara Maria", Amalia, Maria, Irina, Ştefan. Între ei s-a format o legatură, probabil menţinută de întâlnirile lor obişnuite de Crăciun, dar şi de ocaziile în care ei îşi petrec timpul împreună, aşteptând părinţii să îşi termine treaba sau de întâlnirile cu Nadir, care îi tot răsfăţă cu tot felul de dulciuri.

Moş Crăciun nu a uitat niciodată să vină în IBPC, nici măcar atunci când avea glas de fata (Florentina), neexistând niciun băiat doritor să preia acea "funcţie"!

Nu pot să nu amintesc măcar de sesiunile anuale ale Societăţii Naţionale (Române) de Biologie Celulară, care ne-au apropiat şi ne-au ajutat să ne cunoaştem mai bine între noi, fraţii SNBC-işti. Totodată, cu aceste ocazii am cunoscut şi multe din frumuseţile ţării, prin excursiile memorabile organizate în fiecare an (în Marmureş, Băile Felix, Nordul Moldovei, Dunărea de la Cazane şi până la Deltă).

Şi iată-ne în 2019, când institutul împlineşte 40 de ani de existenţă, iar pentru mine...25 ani de când îmi e a doua casă! Ar mai fi multe de spus depre atâtea amintiri frumoase, atâtea momente de bucurie si satisfactii! Dar cum o imagine face cât o mie de cuvinte, am presărat printre rânduri câteva poze.

La mulţi ani, IBPC! La mulţi ani, IBPC-işti!

Acad. Anca V. Sima
IBPC-NS

IBPC-NS- 40 - "Vivat, crescat, floreat!"

La ceas aniversar, voi incerca să scriu câteva gânduri în numele tinerilor care acum 40 de ani au pus bazele IBPC şi al celor care azi continuă să dezvolte Institutul. Nu poți să te gândești la IBPC fără a avea în minte chipurile luminoase ale celor doi mentori ai noștri, domnul Profesor Nicolae Simionescu și doamna Academician Maya Simionescu. La 3 septembrie 1979 s-a inaugurat institutul nostru; acum știm că atunci s-a născut o stea. O stea care pentru mulți dintre noi a fost benefică: pentru unii a însemnat o carieră într-un institut de excelență în România, pentru alții a însemnat un pașaport pentru laboratoare de excelență din străinătate. Cred ca toți am fost foarte câstigați!

Așa cum se știe, ideea înființării IBPC a plecat de la colaborarea celor doi maeștri ai noștri cu Domnul Profesor George Emil Palade la universitățile Rockfeller și Yale în SUA. Profesorul Palade prezintă foarte analitic acest fapt: "După mutarea la Yale, o altă preocupare majoră a intrat în viața lui Nicolae Simionescu, fiindcă el socotea că un Institut de Biologie și Patologie Celulară trebuie realizat și poate fi realizat la București. A început să lucreze la planurile unui nou laborator care urma să fie construit în București. Inițiativa i-a aparținut în întregime. Rolul meu în aceast nou proiect a fost de a găsi împreună cu el căile și mecanismele care să asigure viabilitatea acestui institut."

Clădirea Institutului s-a proiectat și creat fizic după planurile profesorului Simionescu. A fost apoi mobilat și înzestrat cu oameni aleși de dânsul și doamna Maya. O parte din tinerii specialiști au fost trimiși la instruire în străinătate (SUA). Ideea pe care Domnul Profesor Simionescu a menționat-o în repetate rânduri viza conceptul care a stat la baza acestui institut: „De la crearea lui, Institutul nostru a fost o instituţie de cultură în care să se lucreze ştiinţă. Această concepţie are la bază două idei general acceptate: ştiinţa este parte a culturii, iar cultura înseamnă trei lucruri: creaţie, asimilare şi transmitere de valori. Cu acestea in minte, iată-ne la începutul activităţii Institutului, înconjuraţi de un grup de tineri deosebit de înzestraţi şi entuziaşti. De la început noi, cei doi seniori, am avut sentimentul responsabilităţii de a le asigura nu numai aparate, chimicale şi cărţi, ci şi condiţii pentru o formare complexă, în care să se îmbine armonios un înalt profesionalism cu o largă şi nesaturată deschidere spre mesajele perene ale culturii". Este adevarat că indrumarea noastră a fost făcută aprofundat și perseverent, de la detaliile de experiment, la modul de a păstra și scrie Caietul de experiment, de la repetițiile pentru prezentările la congresele la care urma să participăm, până la redactarea clară și concisă a lucrărilor științifice. IBPC a fost (și este) o SCOALĂ, acoperind toate planurile culturii, nu numai cel științific.

Voi încerca să ilustrez aceasta prin cuvintele pe care le-a spus Domnul Profesor cu diferite ocazii. La înființarea Societății Naționale de Biologie Celulară, în 1982 - în acele momente cuvintele Profesorului nostru, luările sale de poziție, publice, erau extraordinare pentru noi tinerii și pentru atmosfera care exista în IBPC: "Să ne aducem aminte de minunaţii cărturari şi oameni de ştiinţă ai ţării noastre care, în vremuri grele, au ştiut să găsească resursele spirituale şi fizice pentru a crea asociaţii şi societăţi ştiinţifice şi culturale ce au modulat hotărâtor istoria social-politică şi culturală a ţării. Să înţelegem obligaţia ce ne revine de a lăsa generaţiilor viitoare un început de drum", obligație pe care dânsul și-a indeplinit-o cu asupra de măsură. Sigur că în timpul acesta, lucrul se desfășura în

institut cu intensitate, cu rezultate publicate în reviste internaționale de prestigiu. Domnul Profesor a știut să ne facă să fim mândri de ceea ce realizam împreună, a știut să ne facă să ne bucurăm împreună.

Domnul Profesor ne ținea atenția și interesul treaz și avea o poziție explicită și față de ceea ce se petrecea în societate. In 1994, când în ciuda asteptărilor mari pe care le-am avut cu toții de la noile timpuri, Știința și Cercetarea erau ținute în continuare ca Cenușărese, Domnul Profesor afirma: "Unii contestă rolul cercetării, şi îndeosebi a celei fundamentale, în progresul socio-economic, în felul acesta condamnând ceea ce nu înţeleg. De aceea, în aceste vremuri, comunitatea ştiinţifică trebuie să iasă din pasivitatea ei şi să-şi impună punctele de vedere pentru a schimba mentalitatea organelor de decizie... Democraţia nu înseamnă populism şi politicianism declarativ. Democraţia implică competenţă, responsabilitate şi intelectocraţie... Adevărul mărunt se exprimă prin vorbe, adevărul mare se exprimă prin fapte."

A venit anul în care a trebuit să ne despărțim de domnul Profesor - a trecut din viață pe placa care dă azi nume Institutului nostru.

A fost foarte greu fără dânsul și în momentele grele ale anului 1995, Doamna Maya a luat dificila hotărâre de a continua singură opera pe care au inceput-o împreună, cu energie și determinare, cu eleganță, și mai ales cu o infinită deschidere către tineri. Atragerea de tineri în institut a continuat și în următorii ani, pentru că acesta este modul de viață al institutului și motivația lui de a exista. In continuare s-au depus eforturi pentru a obține fonduri de cercetare, pentru că Doamna Maya știe că toate titlurile, medaliile și diplomele prin care îi sunt recunoscute meritele științifice și cele de creator de școală de excelență, înseamnă și atragerea de sume de bani necesare cercetărilor. Sigur că în anii ce au urmat, Doamna Maya ca Vicepreședinte al Academiei Române și Director al Institutului a condus înainte planurile, obținând numeroase premii, dintre care mie mi se pare semnificativ Premiul atribuit de Președintele României pentru eforturile personale în conducerea Institutului nostru și apoi, Premiul acordat Institutului pentru realizări științifice deosebite. Acoperind munca a doi oameni, excepționali prin viziune și energie, doamna Maya a reușit să mențină Școala de la IBPC, a continuat să învețe tinerii, să îi strângă în jurul ei, să organizeze petrecerile noastre tradiționale de Crăciun, să îi învețe să danseze și să cânte, să atragă admirația multora dintre oamenii de știință care ne-au vizitat în cadrul multor workshop-uri, simpozioane și congrese pe care le-am organizat. Profesorul Jean-Charles Fruchart de la Universitatea de Medicină și Farmacie din Lille spunea: "Bravo Maya, pentru că ai știut să motivezi atâția tineri excelenți și să le dai speranță". Este într-adevar uluitor cum poți să mobilizezi tinerii punându-le înainte un ideal, mobilizându-i la construcția a ceva durabil, făcându-i părtași la realizare și la succes.

Dragă Doamna Maya,

acum, la Ceas Aniversar, vă doresc "La mulți ani!" la cârma institutului, multă putere și răbdare de a instrui viitoarele generații de tineri care vor veni și intregului Institut "Vivat, crescat, floreat!"

Teodora Barbălată
Doctorand IBPC "N. Simionescu"

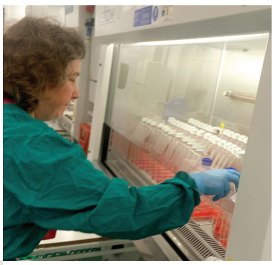
Gânduri ale unui cercetator începător

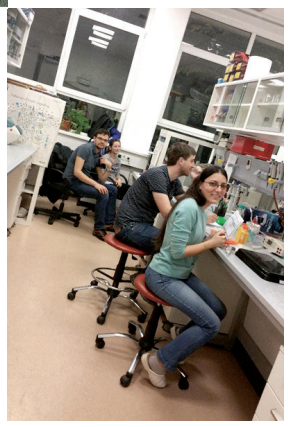
40 de ani de IBPC. Aproape dublul vârstei mele și cu mult mai mult decât timpul pe care l-am petrecut eu până în prezent în acest Institut de prestigiu. Povestea mea în IBPC a început în ianuarie 2017, când, fiind studentă în anul întâi de master, căutam un loc de munca. Îmi doream să ajung într-un loc în care să am parte de provocări intelectuale și de cât mai puțină rutină. În încercările de a-mi da seama ce mi-ar plăcea să fac, am realizat că domeniul care mi s-ar potrivi cel mai bine este cercetarea, așa că, odată ce am văzut anunțul pentru un post vacant de asistent de cercetare, mi-am propus să mă înscriu la concurs. Astfel, am ajuns în Departamentul de Lipidomică, aflat sub coordonarea doamnei Acad. Anca Sima, iar cu bunăvoința dumneaei și a doamnei Acad. Maya Simionescu, a început povestea mea în rândul IBPC-iștilor.

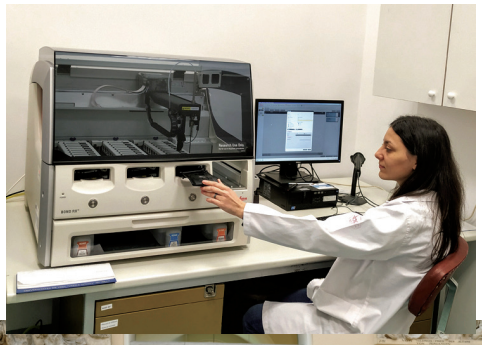
Aici am găsit un colectiv deosebit de înzestrat pentru știință, dar mai ales răbdător și deschis la a mă îndruma și învăța. Aici am învățat și încă învăț cum se face știința de calitate, cu simț de răspundere, învăț să mă autodepășesc și să îmi setez țeluri cât mai înalte, avându-i ca model pe cei cu mai multă experiență din Institut. Aici învăț zilnic că rezultatele de calitate se obțin cu multă muncă, perseverență și determinare și că greșelile sunt importante și necesare, întrucât dau naștere unor rezultate temeinice.

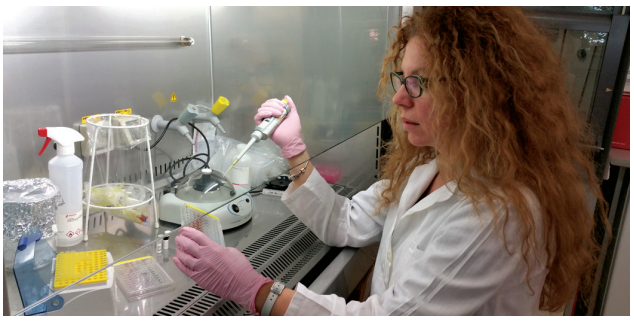
În prezent, sunt studentă în primul an de doctorat, iar în pregătirea pentru examenele din programa academică, am avut plăcerea să parcurg multe dintre lucrările pe care le-a dat Institutul nostru de-a lungul celor 40 de ani. Nu am putut să nu remarc răbdarea, volumul imens de muncă și determinarea care transpar din toate aceste lucrări. Deși nu am avut onoarea de a-l cunoaște pe domnul Acad. Nicolae Simionescu, sau "domnul Profesor" așa cum îl numesc majoritatea, în Institut încă se resimte esența dumnealui, precum și idealurile și învățăturile sale, atât de evidente și astăzi. Ștafeta a fost preluata de doamna Acad. Maya Simionescu, care ne îndrumă cu răbdare și dibăcie, dar și cu rigurozitate, și care ne-a insuflat etica dumneaei de muncă, fără de care nu ar fi posibile toate rezultatele deosebite ale Institutului.

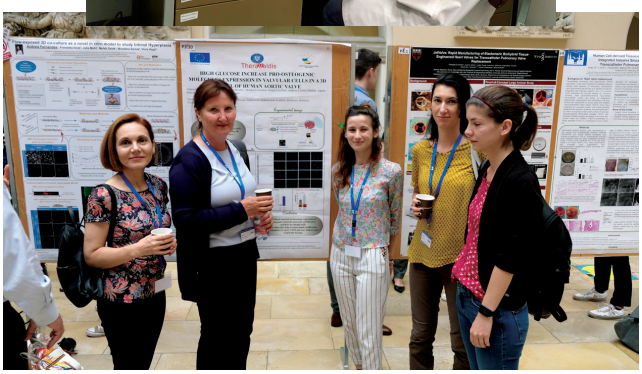
Cu ocazia împlinirii celor 40 de ani, nu îmi pot dori altceva decât ca și de acum înainte să creștem împreună la fel de frumos, să ne păstrăm aceleași standarde ridicate și să continuăm în a face știință bună, de calitate. De asemenea, cred că e un prilej potrivit să mulțumesc colectivului IBPC pentru sprijinul pe care l-am primit în dezvoltarea mea profesională, cu certitudinea că încă mai am multe de învățat, și nu în ultimul rând pentru căldura pe care am resimțit-o din partea colegilor și pentru că, atunci când am avut nevoie, am găsit înțelegere și un zâmbet.

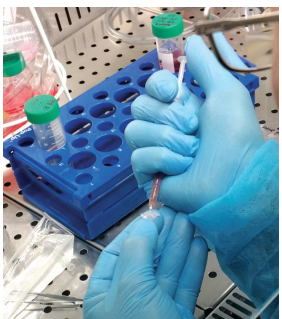


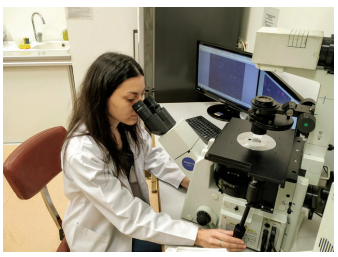












Acad. Lucia-Doina Popov

In loc de concluzii

Școala Profesorilor Maya și Nicolae Simionescu - „o școală ridicată la rang de instituție”

În drum spre casă, treceam adesea pe lângă un hățiș de vegetație de pe strada Bogdan Petriceicu Hașdeu, situat lângă curtea Facultății de Biologie. La un moment dat (era în 1974) hățișul a fost înlocuit de șantierul unei clădiri. A urmat cutremurul din 1977, iar clădirea de pe strada Hașdeu se apropia de finalizare. Nu știam ce este sau ce urmează sa fie acolo, până în august 1978 când am pășit pragul noului Institut de Biologie și Patologie Celulară (IBPC). Era încă șantier pe strada Hașdeu, locul ales în mod fericit de cei doi co-fondatori, Profesorii Nicolae Simionescu și Maya Simionescu.

Ideia unui institut științific dedicat introducerii biologiei celulare moderne în România îl preocupa pe Prof. Nicolae Simionescu încă din 1970 când nota:

“O, dacă aş putea crea un … crâmpei de viaţă adevărat, măcar pentru generaţiile vitoare de cercetători...”.

Mai mult, într-un interviu ulterior, răspundea la întrebarea *“Cum s-a născut ideea institutului?”*: *“ Credem, şi eu şi Maya, în puterea instituţiilor.* ***Să faci****, ceea ce se spune în termeni mai pedanţi,* ***o şcoală. O şcoală pe care să o ridici la rangul de instituţie.*** *Şi cum în anii în care noi am început activitatea în America, virtual biologia celulară nu exista în România, gândul de a fi întemeietorii acesteia aici l-am avut în permanenţă… [1].*

Prin grija celor doi co-fondatori, Profesorii Nicolae și Maya Simionescu, noul institut a fost dotat cu cea mai recentă tehnologie în biologie celulară la acea vreme și a fost selectată
prima echipă a școlii românești de biologie și patologie celulară; tematica reprezenta/reprezintă și astăzi un domeniu științific și social important, cel al studiului sistemului cardiovascular - la nivel celular și molecular - în condții fiziologice și patologice.

În urmă cu patru decenii, la început de septembrie, a avut loc deschiderea oficială a Institutului. A demarat totodată **o școală de biologie celulară modernă** în țara noastră. **Care sunt trăsăturile distinctive ale acestei școli?**

Realizarea doctoratului în biologie a început în anul 1979, când IBPC (afiliat atunci Ministerului Învățământului) a dobândit calitatea de Instituție Organizatoare de Doctorat. Această calitate s-a păstrat și după ce IBPC a trecut sub egida Academiei Române, iar activitatea de doctorat a fost și este integrată în Școala Doctorală a Academiei Române. Pe parcursul a patru decenii au fost elaborate un număr de peste 50 de teze de doctorat, sub conducerea exigentă a Acad. Nicolae Simionescu, Acad. Maya Simionescu și a încă 6 cercetători gradul 1 din institut.

Prezentarea în cadrul seminariilor a progreselor în temele de cercetare, seminariile metodologice și discuțiile cu caietul de experimente în față împreună cu cei doi mentori evidențiau esențe și ajustau parcursul temelor spre noi căi experimentale, relevante și mai eficiente. Seminariile metodologice au avut inițial rolul de familiarizare a cercetătorilor cu aparatura institutului; în timp, și-au păstrat actualitatea, fiind dedicate, în pas cu vremurile, aparaturii noi aferentă proiectelor in curs. Cu toții eram impresionați de profunzimea cunoștințelor mentorilor noștri, de conexiunile biologiei celulare cu fiziologia, biochimia,

morfologia, medicina, etc. Personal, intuiam noi idei de lucru pe care abea așteptam să le experimentez și prefiguram pașii următori de parcurs. Am pierdut numărul seminariilor și discuțiilor, dar importantă este strategia și continuitatea acestora în timp, inclusiv azi.

Expunerea cercetătorilor români ***la manifestările științifice internaționale organizate de institut*** la care au fost invitați să susțină conferințe personalități din domeniul biologiei celulare, conducători ai unor prestigioase laboratoare din SUA și Europa a fost un alt aspect ***al școlii de biologie celulară si moleculara care se desfasura in Institut.*** Amfiteatrul devenea neîncăpator pentru cercetătorii și cadrele didactice din întreaga țară care veneau să afle noutățile din domeniu. Mulți participanți mărturiseau că aceste sesiuni științifice au fost prilejul fericit de a înțelege - de la sursă - biologia celulară modernă. Noi, echipa, prezentam rezultatele proprii, fie sub formă de conferințe, fie sub formă de postere. Diapozitivele prezentării trebuiau să fie perfecte atât ca formă cât și în conținut: să nu aibă mai mult de 7-9 rânduri pentru a fi ușor urmărite de auditoriu, iar, după caz, engleza trebuia să fie perfectă. În acest scop și pentru încadrarea în timpul rezervat, înaintea prezentării în plen făceam repetiții, asistați de toți colegii.

În anii de început, pregătirea posterelor ce urmau să fie expuse la manifestări științifice prilejuia o efervescență deosebită. Modelul de postere era cel curent al congreselor științifice din SUA, adaptat și îmbunătățit de Profesorii Nicolae și Maya Simionescu în IBPC. În seara dinnaintea simpozioanelor, posterele erau vizionate/evaluate „ în premieră" de mentorii noștri. De-a lungul anilor, în institut au avut loc numeroase Simpozioane internaționale prilejuite de varii contacte/contracte și de câștigarea unor prestigioase Grant-uri majoritatea având ca inițiator și director de proiect pe Nicolae Simionescu și Maya Simionescu.

Școala de biologie celulară modernă a fost/este diseminată în toată țara de ***Societatea Națională (azi, Română) de Biologie Celulară (SRBC)*** fondată sub auspiciile institutului, la inițiativa Prof. Nicolae Simionescu. În discursul inaugural din 2 iunie 1982, Prof. Nicolae Simionescu - primul Președinte - preciza următoarele: *„Nu e nevoie de "încă o Societate" ci, de una care să vrea şi să poată efectiv reprezenta un mijloc eficace de a ajuta dezvoltarea la parametrii deceniilor moderne a cercetării biomedicale, a* ***învăţământului biologic şi medical.*** *SNBC să fie o Societate a unor oameni curajoşi, demni şi neabătuţi în dorinţa de a face ceva bun pentru ţara noastră"*. Membrii Societății au avut la dispoziție un volum anual, "Buletinul SNBC". Primele numere au cuprins aspecte organizatorice, științifice și opinii asupra nomenclaturii corecte în limba română a termenilor de specialitate noi din literatura engleză. Apoi, volumul a cuprins programul și rezumatele prezentate la Sesiunile științifice anuale și a fost pentru mulți membrii, o referință bibliografică importantă. În prezent, revista SRBC se intitulează "Annals of the Romanian Society for Cell biology", publică articole științifice în limba engleză, apare de trei ori pe an și este în curs de evaluare pentru atribuirea factorului de impact. Un rol esential in

elaborarea revistei l-au avut Prof. Aurel Ardelean (Universitatea de Vest „Vasile Goldiş" din Arad) şi Prof. Constantin Crăciun (Universitatea „Babeş-Bolyai"din Cluj-Napoca).

După ce Acad. Nicolae Simionescu ne-a părăsit, Preşedintele Societăţii, a fost/este Acad. Maya Simionescu care continuă şi dezvoltă cu succes obiectivele societăţii : promovarea progreselor ştiinţifice în domeniul biologiei celulare şi moleculare normale şi patologice, organizarea şi dezvoltarea cooperării multidisciplinare specifice domeniului, sprijinirea cercetărilor fundamentale de largă perspectivă. Diseminată la nivel naţional, SRBC are în prezent peste 500 membrii şi 13 filiale. Remarcabil, se păstrează tradiţia desfăşurării de Sesiuni Stiinţifice anuale în principalele centre universitare şi academice ale ţării.

Un demers de succes, o altă faţetă a şcolii *„Simionescu"* este şi ***Cursul Internaţional Postuniversitar de Perfecţionare. "De la Biologia Celulară şi Moleculară la Medicina Secolului XXI"*** desfăşurat în institut, cuprinzând conferinţe ale unor personalităţi din ţară şi de peste hotare şi demonstraţii şi lucrari practice; Director, Acad Maya Simionescu, director executiv
Acad. Anca Sima.

Deşi ar mai fi multe de spus despre şcoala din institut, am datoria de onoare de a face o reverenţă către mentorii noştri care ne-au educat în toate faţetele cercetării ştiinţifice, de la documentatie la experimentare, la redactarea cu succes a lucrărilor, la ilustrarea clară a rezultatelor experimentale si mai ales de a trece peste dezamăgiri şi a merge cu un zâmbet mai departe, după propriul lor exemplu.

•••

Pe strada care poartă numele marelui cărturar Bogdan Petriceicu Haşdeu, din Bucureşti există şi creşte ***şcoala "Profesorilor Maya şi Nicolae Simionescu"*** de biopatologie celulară şi moleculară modernă. Este o şcoală deschisă oricărui tânăr înzestrat care are curiozitatea de a descifra în profunzime mecanismele implicate în funcţionarea normală/anormală
a celulei vii.

Epilog

Pasiunea pentru ştiinţă a celor doi co-fondatori ai Institutului şi dedicaţia acestora au constituit "solul" fertil în care Institutul s-a înrădăcinat acum patru decenii şi înfloreşte în prezent. Institutul este un teren propice pentru inspiraţie ştiinţifică, experimentare şi realizări; este un orizont deschis care oferă o şansă şi un viitor cercetătorilor genuini.

Câte generaţii de cercetători s-au format în Institut? Cel puţin patru, câte una la fiecare zece ani.

Pentru anii ce vin văd Institutul ca un centru de primă mărime în transferul ştiinţei fundamentale în terapii de success. Se poate afirma cu siguranţă faptul **că drumul Şcolii de Biologie « Simionescu » merge numai înainte.**

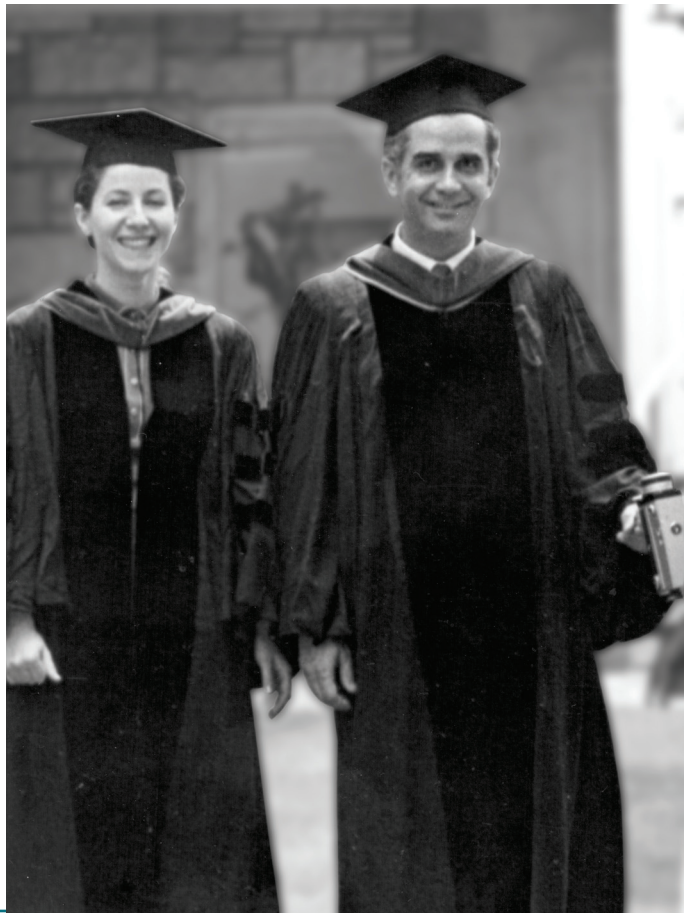
Epilogue

The passion for science of the two founders of the Institute, and their devoted commitment were the fruitful soil where the Institute was rooted four decades ago and is now flourishing. The Institute is a fertile ground for scientific inspiration, experimentation, and accomplishments; it is an open horizon, and every bright minded scientist has

a chance and a future in here.

How many successful generations have been raised around it? At least four, one for each decade.

During the following years I am foreseeing the Institute as a leader in translation of basic science into successful therapies. One can safely state **that the path of "Simionescu`s" Biology School is moving only forward).**



Bibliografie

[1] Prof. Nicolae Simionescu în interviu cu dl. Nicolae Tzone, în Institutul Simionescu, 30 ani, Imposibilul nu există…/memento Nicolae Simionescu, editori: Ileana Mânduțeanu, Loredan Stefan Niculescu, Maya Simionescu, Fundația Națională pentru Știință și Artă, 2009, p. 111-128.

ACADEMIA ROMÂNĂ

INSTITUTUL DE BIOLOGIE SI PATOLOGIE CELULARA
“NICOLAE SIMIONESCU”

INVITATIE - PROGRAM

IBPC

NICOLAE SIMIONESCU

SIMPOZION ANIVERSAR

bucuresti 19-20 septembrie 2019

PROGRAM

Joi, 19 Septembrie 2019 - Aula Academiei Romane

9.30 - 10.15 Deschiderea Simpozionului

Acad. Ioan -Aurel Pop – Președintele Academiei Române
Acad. Maya Simionescu–Director al IBPC "N. Simionescu"

10.15 -11.30 Evocări

Prof Sam Silverstein – Columbia University Medical Center, USA
Prof. Irinel Popescu – Președintele Academiei de Ştiinţe Medicale
Prof. Radu Deac – Vicepreședintele Academiei de Ştiinţe Medicale
Prof. Jean Askenasy – University of Tel-Aviv, Israel
Prof. Werner Franke – German Cancer Research Center, Germany
Acad. Doina Popov – IBPC "N. Simionescu"
Dr. Anca Dobrian – Eastern Virginia Medical School, USA
Prof. Angello Azzi – Tufts University, USA
Dr. Florea Lupu – Universitatea din Oklahoma, USA

11.30-12:00: Fotografie de grup – Pauză de cafea

12:00 -13:45: Descoperiri, noutăți în laboratoarele IBPC-NS
CHAIRS: Doina Popov, Jean Askenasy

13:45-15:00: Sesiune de postere: Proiectul Theravaldis

15.00- 19.00: **Workshop THERAVALDIS**: "Bolile valvelor cardiace: noi ţinte pentru terapii şi inginerie tisulară"
CHAIRS: Werner Franke, Ileana Mânduțeanu, Agneta Simionescu

Vineri, 20 Septembrie 2019
Amfiteatrul George Emil Palade, IBPC „N. Simionescu"

9.00-11.05 Sesiune Ştiinţifică I: "Celule și gene"
CHAIRS: Dimitris Kardassis, Anca Sima

9.00-9.25 Jean Askenasy
9.25-9.50 Anca Dobrian
9.50-10.15 Angelo Azzi
10.15-10.40 Dimitris Kardassis
10.40-11.05 Mircea Ivan

11:05-11:30 Pauză de cafea

11.30-14.00 Sesiune Ştiinţifică II: "Funcţia și disfuncţia celulelor"
CHAIRS: Angelo Azzi, Florin Lupu

11.30-11.55 Sam Silverstein
11.55-12.20 Florin Lupu
12.20-12.45 Cristina Lupu
12.45-13.10 Alexandru Șchiopu
13.10-13.35 Zorina Galiș
13.35 -14.00 Șerban Moroșan

14.00 -15.30 Sesiune de postere

15.30-19.00 Workshop DIABETER: „În căutarea unei terapii inovatoare pentru diabetul de tip 1"
CHAIRS: Maya Simionescu, Nadir Askenazy

Încheierea Simpozionului Aniversar

Institutul de Biologie si Patologie Celulara "N. Simionescu"
Str. B.P. Hașdeu nr. 8, București, Telefon: +4021.319.45.18; Fax: +4021.319.45.19; www.icbp.ro

NOI

AZI

2019

Acest volum de amintiri este publicat cu ocazia celei de a 40-a aniversări a Institutului de Biologie și Patologie Celulară ”Nicolae Simionescu”

Editare:
MAYA SIMIONESCU
ANCA SIMA
ILEANA MÂNDUȚEANU
Membri ai Academiei Romane

Viziune grafică si coperta:
OVIDIU CROITORU

Arhiva foto:
MIREL POPA

Tipărit cu sprijinul:

ComputerLand® ROMÂNIA
Business to business. Person to person.
www.computerland.ro

FUNDAȚIA NAȚIONALĂ PENTRU STIINȚĂ ȘI ARTĂ
ISBN: 978-606-555-271-5

Copyright 2019, Institutul de Biologie și Patologie Celulară”Nicolae Simionescu”
Toate drepturile rezervate. Nicio parte a acestei publicații nu poate fi reprodusă, arhivată sau transmisă, sub orice formă, electronică, mecanică, fotocopiată, înregistrată sau in alt mod, fără permisiunea scrisă a autorilor.

Institutul de Biologie Celulară și Patologie ”Nicolae Simionescu”
Strada B.P. Hasdeu nr. 8, 050568
București, România
Telefon: (004021) 319.45.18; (004021) 319.45.24;
Fax: (004021) 319.45.19
www.icbp.ro

CODE OF ETHICS

The Institute of Cell Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"

ROMANIAN ACADEMY

2024

INSTITUTE OF CELL BIOLOGY AND PATHOLOGY"NICOLAE SIMIONESCU"

CODE OF ETHICS AND INTEGRITY IN SCIENTIFIC RESEARCH OF THE STAFF OF THE INSTITUTE OF CELL BIOLOGY AND PATHOLOGY "NICOLAE SIMIONESCU"

Edition I / Revision 1
Introduction

This Code of Ethics and Integrity in Scientific Research represents a guide of behavior in different institutional situations, defines and establishes the values, principles and rules of ethics and professional conduct that all employees of the Institute of Cell Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" (ICBP-NS) are obliged to respect and apply in their work:

- within the institution, in line with the institution's values and objectives, in order to maintain an efficient and constructive working climate;
- outside the institution, in the relations it develops with all categories of public or private, national or international, natural or legal persons or institutions in order to maintain and improve the image and reputation of the institution.

CHAPTER 1. SCOPE AND GENERAL PRINCIPLES

Art. 1. Scope

(1) This Code of Ethics and Integrity in Scientific Research applies to all ICBP-NS contract staff, regardless of their position or the duration of their individual employment contract, as well as to seconded or delegated staff.

(2) All ICBP-NS employees are required to conduct their professional activities in accordance with the rules of ethical conduct and professional integrity set out in this Code of Ethics and Integrity in Scientific Research.

Art. 2. Purpose

(1) The purpose of this Code of Ethics and Integrity in Scientific Research is to regulate the rules of ethical conduct and professional integrity necessary to establish social and professional

relations between ICBP-NS employees or between ICBP-NS and external institutions or persons, which ensure a working climate based on trust and mutual respect, with the objectives of increasing the quality of professional activity and the prestige of the institution.

(2) Compliance with these rules of ethical conduct and professional integrity determines good conduct in scientific research, technological development and innovation.

Art. 3. Definition of terms

For the understanding of this Code of Ethics and based on the Law no. 206/27.05.2004 on good conduct in scientific research, technological development and innovation, amended and supplemented by Law 398/30.10.2006, GEO no. 28/31.08.2011 and Law 183/10.06.2024, the following terms are defined:

a) public interest - that interest which involves the guarantee and respect by public institutions and authorities of the rights, freedoms and legitimate interests of citizens, recognized by the Constitution, domestic legislation and international treaties to which Romania is a party, as well as the performance of service duties, in compliance with the principles of efficiency and economy in the expenditure of resources;

b) personal interest - any material or other advantage, whether directly or indirectly for oneself or for others, pursued or obtained by contract staff through the use of reputation, influence, facilities, relations, information to which they have access, as a result of the performance of their duties;

c) conflict of interest - a situation in which the personal interest, direct or indirect, of the contractual employee is contrary to the public interest, in such a way that it affects or could affect the independence and impartiality in decision-making or the timely and objective fulfillment of the duties incumbent upon him/her in the exercise of his/her office, as provided by law;

d) information of public interest - any information relating to the activities or resulting from the activities of a public institution, whatever its medium;

e) personal data information - any information relating to an identifiable person;

f) Ethics Committee - a committee responsible for investigating breaches of ethical rules and applying sanctions provided for by law, regulations or internal provisions;

g) Ethical misconduct - any culpable act committed in connection with the activity performed, consisting of an action or inaction, which violated the provisions in the field of ethics and any other internal regulations or provisions in the field of ethics, issued by the IBPC- NS management;

h) warning in the public interest - a report made in good faith about any act involving a breach of the law, professional ethics or the principles of good administration, efficiency, economy and transparency;

i) whistleblower - the person who makes the report described in point h) and who is employed in a public institution;

j) co-author of a publication - any person named in the list of authors of a scientific publication;

k) fabrication of results or data - reporting fictitious results or data that are not the actual result of a research and development activity;

l) falsification of results or data - selective reporting or rejection of unwanted data or results; manipulation of representations or illustrations; altering experimental or numerical apparatus to obtain desired data without reporting the alterations made;

m) plagiarism - the presentation in a written work or oral communication, including in electronic format, of texts, expressions, ideas, demonstrations, data, hypotheses, theories, results or scientific methods taken from written works, including in electronic format, of other

authors, without mentioning this fact and without reference to the original sources;
n) self-plagiarism - the use in a written work or an oral communication, including in electronic form, of texts, expressions, demonstrations, data, hypotheses, theories, results or scientific methods extracted from written works, including in electronic form, by the same author(s), without mentioning this fact and without reference to the original source(s);

Art. 4 General principles

(1) The principles governing the ethical conduct and professional integrity of ICBP-NS staff are as follows:
a) the supremacy of the Constitution and the law, a principle according to which all ICBP-NS employees have the obligation to respect the Constitution and the laws of the country by their acts and deeds, and to act for the implementation of legal provisions, in accordance with their duties, respecting professional ethics;
b) public interest override - the principle that employees have a duty to put the public interest before personal interest in the performance of their duties;
c) non-discrimination, a fundamental principle of law enshrined in Art. 16 para. (1) of the Constitution, according to which all citizens are equal before the law and public authorities, without privilege and without distinction based on race, nationality, ethnicity, language, religion, social category, beliefs, sex or membership of a disadvantaged category;
d) impartiality and independence, a principle according to which employees are required to have an objective attitude, neutral with regard to any political, economic, religious or other interests, in the performance of their duties;
e) moral integrity, a principle according to which employees are prohibited from seeking or accepting, directly or indirectly, for themselves or for others, any moral or material advantage or benefit, or abusing in any way their position;
f) freedom of thought and expression, which means that employees are free to express and substantiate their opinions, subject to the rule of law and good morals;
g) honesty and fairness, the principle that in the performance of their duties and in the exercise of their functions employees must act in good faith and in accordance with their duties;
h) professionalism, the principle according to which employees are required to carry out their duties with responsibility, professional competence, efficiency, promptness, promptness, fairness and conscientiousness;

(2) The principles governing the protection of public interest warning of ICBP- NS staff who report breaches of the law are as follows:
j) accountability, the principle according to which anyone who reports breaches of the law is obliged to back up the complaint with evidence of the wrongdoing;
k) non-abusive non-sanctioning, the principle according to which persons who complain about or report breaches of the law may not be sanctioned directly by the application of an unfair sanction or by the application of a more severe sanction in the case of disciplinary offences;
l) good faith, the principle according to which the ICBP-NS employee is protected if he/she is convinced of the reality of the state of facts or that the fact constitutes a violation of the legal regulation;
m) confidentiality, the principle that employees have a duty to protect information that is not public and not to use it for personal purposes or in a manner contrary to the law;
q) professional conduct, the principle that employees must act in such a way that they do not bring the institution's work into disrepute;

CHAPTER II. FUNDAMENTAL VALUES

Art. 5 The ICBP-NS Code of Ethics includes a series of values that aim to maintain and increase the prestige of the institution.
Art. 6 ICBP-NS staff, including senior management, upholds and promotes ethical values and professional and personal integrity consisting of:

a) professional competence;
b) transparency and initiative by example;
c) compliance with specific laws, regulations and rules;
d) respecting the confidentiality of information;
e) fair treatment and respect for collaborators, partners and citizens;

Art.7 The staff working within the ICBP-NS has the obligation to demonstrate professional andpersonal integrity and responsibility in the activities they perform;
Art. 8 ICBP-NS ensures the necessary conditions so that all employees are aware of the regulations governing their behavior, prevention and reporting of fraud and irregularities.

CHAPTER III. GENERAL RULES GOVERNING THE PROFESSIONAL CONDUCT OF ICBP-NS EMPLOYEES

Art.9 The rules of ethical and professional conduct are binding for all IBPC-NS staff, regardless of hierarchical level, who must be aware of, understand and act in accordance with the provisions of this Code of Ethics and Integrity in Scientific Research.

Art. 10 Respect for the Constitution and laws
All ICBP-NS employees have the obligation, by their acts and deeds, to respect the Constitution, the laws of the country and to act for the implementation of the legal provisions, in accordance with their duties, respecting professional ethics.

Art. 11 Ensuring provision of quality services
(1) Employees are required to carry out their work in accordance with the objectives set by the institution, by performing the duties set out in their job description and in accordance with the Rules of Procedure.
(2) In the performance of their duties according to their functions, employees are required to conduct themselves in a professional manner and to ensure, in accordance with the law, administrative transparency in order to maintain the integrity and impartiality of the institution.

Art. 12 Loyalty and institutional prestige
(1) All ICBP-NS employees have the obligation to defend the prestige of the institution and to refrain from any fact or act that damages the image or legal interests of ICBP-NS.
(2) ICBP-NS contract staff is prohibited:

a) expressing in public opinions that are not in line with reality about the work of the institution, its policies and strategies or the projects in which the institution is involved;
b) make unauthorized judgments in relation to pending litigation to which the institution is a party;

c) making unfounded accusations or complaints to colleagues, coordinators or subordinates;
d) engage in activities that would damage the image or prestige of the institution;
e) to disclose information which is not of public interest, other than under the conditions provided for by the legislation in force;
f) to disclose information to which they have access in the course of their duties if such disclosure is likely to bring unknown advantage or harm the image or rights of the institution;
g) to provide assistance and advice to natural or legal persons with a view to bringing legal or other actions against the state or the public authority or institution in which they work.
(3) The disclosure of information that is not of public interest or the handing over of documents containing such information, at the request of representatives of another public authority or institution, is allowed only with the consent of the ICBP-NS management or of the persons delegated for this purpose.

Art. 13 Freedom of opinion

(1) In the performance of their duties, ICBP-NS contract staff is obliged to respect the dignity of their position, linking the freedom of dialog with the promotion of the interests of the institution in which they work.
(2) In their work, employees are obliged to respect freedom of opinion and not to be influenced by personal considerations or popularity.
(3) In expressing their opinions, employees should be conciliatory and avoid generating conflicts due to the exchange of opinions. Equally, contract staff are required to show respect for the private and family life of all persons with whom they come into professional contact.

Art. 14 Public activity

(1) Relations with the mass media shall be ensured by the staff designated for this purpose by the management of the institution, in accordance with the law.
(2) Contract staff appointed to participate in research activities or public debates in an official capacity must respect the limits of the representation mandate entrusted to them by the management of the institution.
(3) If not so designated, employees who participate in public activities or debates are obliged to make it known that the opinion expressed does not represent the official view of ICBP-NS.

Art. 15 Political activity

(1) ICBP-NS contract staff is forbidden to display within the institution, signs or objects inscribed with logos or names of political parties or their candidates.
(2) Employees may participate in fundraising for political party activities or provide logistical support to candidates for public office, but only in their own name and with their own resources, without involving the name, image, resources or premises of the institution.

Art. 16 Use of own image

ICBP-NS contract staff are forbidden to associate their image with their position within the institution for commercial or electoral purposes.

Art. 17 Conduct in international relations

(1) Contract staff representing the institution at international organizations, international scientific events, educational institutions, conferences, seminars and other activities of an international character are required to conduct themselves in such a way as to promote a favourable image of the country and the institution they represent.

(2) When traveling abroad, ICBP-NS employees are required to conduct themselves in accordance with the rules of protocol and are forbidden to violate the laws and customs of the host country.

Art.18 Prohibition on accepting gifts and advantages

IBPC-NS contract staff must not solicit or accept gifts, services, favors, invitations or any other advantage intended for themselves, their family, parents, friends or persons with whom they have had employment relationships, which may influence their impartiality in the exercise of their functions or constitute a reward in connection with those functions.

Art.19 Participation in the decision-making process

(1) In the decision-making process, ICBP-NS employees are obliged to act in accordance with the law and to exercise their judgment in a fundamental and impartial manner.

(2) Officials are prohibited from promising to make a decision within the institution to other officials from other institutions, as well as from performing their duties in a privileged manner.

Art. 20 Objectivity in evaluation

(1) In the performance of their specific managerial duties, ICBP-NS employees are required to ensure equal opportunities and equal treatment with regard to career development for their subordinates.

(2) The management of the institution is required to examine and apply objectively the criteria for assessing the professional competence of subordinate staff when proposing or approving promotions, promotions, transfers or the granting of material or moral incentives, excluding any form of favoritism or discrimination.

(3) It is forbidden for the institution's management staff to favor or disfavor access or promotion in any position based on discriminatory criteria, kinship, affinity or other criteria inconsistent with the principles and values set out in this Code of Ethics and Integrity in Scientific Research.

Art. 21 Misuse of office

(1) It is forbidden for ICBP-NS contract staff to use the prerogatives of their position for purposes other than those provided by law.

(2) The ICBP-NS contract staff is prohibited from seeking to obtain personal gain or advantage or to cause material or moral damage to other persons through their decision-making, project development, evaluation or participation in investigations or control actions.

(3) Employees are prohibited from using their official position or the relationships they have established in the exercise of their functions to influence internal and external investigations or to influence the taking of a certain action.

(4) The employees of the institution are forbidden to force other employees of ICBP-NS to join organizations or associations, regardless of their nature, or to suggest them to do so by promising them undue or illegal material or professional advantages.

(5) Abuse, threats, threats, non-academic language, intimidation or physical or verbal harassment are not permitted or tolerated within the institution.

Art. 22 Use of public resources

(1) Employees of ICBP-NS are obliged to ensure the protection of the property of the state and the institution and to avoid any damage, acting in any situation as a good owner.
(2) The ICBP-NS staff is obliged to use their working time and the property belonging to the institution only for the performance of activities related to their duties.
(3) ICBP-NS employees must ensure, according to their duties, the useful and efficient use of public money, according to the legal provisions.

Art. 23. Conflict of interest

1) Conflict of interest means the situation described in Article 3(c).
2) The principles underpinning the prevention of conflict of interest in the performance of duties are: impartiality, integrity, transparency of decision-making and the primacy of the public interest.
3) Contract staff are in conflict of interest if they are in one of the following situations referred to in Art. 54 paras. (1) and (2) of Law 183/2024:

a) concurrent occupancy of positions by persons who are related by spouses, relatives and blood relatives up to and including the third degree, so that each is in a direct position of institutional management, control, authority or evaluation at any level in the same research organization;
b) sitting as a member of doctoral committees, assessment boards or selection boards, where the decision affects spouses, relatives or affinities up to and including the third degree;
c) the participation in the same commission, constituted according to the law, of persons who have the status of spouse, relative or relative-in-law up to the third degree;
d) the participation of a person, who is a member of MCID committees or councils, in the analysis of a situation related to the research organization to which he/she belongs as a member of the research community;
e) other specific situations laid down in the normative acts applicable to evaluation procedures, including in the information packages of project competitions, in compliance with the legal regulations in force.

(4) A person may not participate directly, as an expert evaluator, or indirectly, by making nominal direct selection or exclusion decisions of expert evaluators in charge of the evaluation of a research organization, project, tender or applicant, if that person is on the staff list of the evaluated research organization, project or tender or of other projects or tenders submitted for funding under the same funding line, call for proposals or call for tenders or if that person is in the following relationship with the applicant or persons on the staff list of the evaluated projects, tenders or research organizations they are spouses, relatives or blood relatives up to and including the second degree.

5) In order to avoid a conflict of interest, ICBP-NS staff are required to:
   a) Not to engage directly or indirectly in business relations with economic operators, whether natural or legal persons, which would affect the correct, honest and

conscientious performance of their duties;

b) Not to be influenced by personal interests, including those of their spouse or first-degree relatives, or by pressure of any kind, in the performance of their duties;
c) Avoid any situation which involves or may give rise to a conflict between the interests of the institution and their own interests, including those of their spouse or first-degree relatives, while respecting the legal provisions and internal procedures relating to conflict of interest;

6) In the event of a conflict of interest, the employee is obliged to refrain from dealing with a request, taking a decision or participating in the taking of a decision and to immediately inform the immediate superior to whom he/she is directly subordinated of the situation. The hierarchical superior is obliged to take the necessary measures to ensure the impartial exercise of his/her duties.
7) In the cases provided for in para. 3), the management of the institution, at the proposal of the hierarchical superior to whom the employee in question is directly subordinated, shall designate another employee with the same professional training.
8) Violation of the provisions of paras. (3), (4), (5) and (6) may entail, as the case may be, disciplinary, civil or criminal liability, according to the law.

Art. 24 Incompatibilities

IBPC-NS employees are forbidden to occupy any other position that generates situations of incompatibility, as provided for in Law no. 161/2003 on some measures to ensure transparency in the exercise of public office, public functions and in the business environment, prevention and sanctioning of corruption, with subsequent amendments and additions.

Art. 25 Fraud

1) Fraud is any illegal act characterized by deception, concealment or breach of trust.
2) Fraud is committed by parties or organizations to obtain money, property or services, to avoid payment or loss of services, or to secure personal or institutional advantage.
3) Types of fraud:
    a) Misappropriation of assets - e.g. theft, embezzlement;
    b) Corruption - e.g. using influence to gain advantage;
    c) Fraudulent misrepresentation - e.g. false financial/other statements.
4) An employee who, in the performance of his or her duties, becomes aware of facts which may involve illegal activity, fraud or corruption detrimental to the interests of the institution is obliged to inform the management of the institution or the competent judicial bodies immediately.

CHAPTER IV. RULES OF BEHAVIOR AND ETHICAL CONDUCT

Art. 26. Framework of relations in the exercise of the duties corresponding to the function

1) IBPC-NS contract staff is obliged to behave with respect, good faith, fairness, propriety, good manners and courtesy in their relations with all employees and with natural or legal persons.

2) IBPC-NS employees have the obligation not to harm the honor, reputation and dignity of persons within the institution in which they work, as well aspersons with whom they come into contact in the exercise of their duties, by:

a) Using offensive language;

b) Revealing aspects of your private life;

c) Making libellous complaints;

d) Failure to adopt an impartial attitude to deal effectively with the problems arising from the exercise of the function.

3) IBPC-NS employees must adopt an impartial attitude for the clear and efficient resolution of service issues involving relations with people and eliminate any form of discrimination based on nationality, religious and political beliefs, material status, health, age, sex or other aspects.

Art. 27 Rules of behavior and conduct in relations between colleagues.

Relations between fellow employees should be based on respect, cooperation and mutual support and subject to the principles of collegiality, equality and fairness. Team spirit and consensus, openness to suggestions and constructive criticism should be promoted.

Art. 28 Violations of the principle of collegiality:

a) Discrimination, gender, ethnic or any other form of harassment, the use of physical or psychological violence, offensive language or abuse of authority against an employee of the institution, regardless of the position held by the employee within the IBPC-NS;

b) Promotion or toleration of behavior contrary to the rules of this Code of Ethics and Integrity in Scientific Research by contract staff;

c) Discrediting a colleague's ideas, assumptions or results unfairly;

d) Expo an individual inside or outside the institution uncourteous remarks about a colleague's professional training, conduct or private life;

Art. 29 Confidentiality of data and information

1) Data and information that are not public, as required by law, such as: personal data of employees, internal documents issued in confidence, data and information from partners or collaborators, are considered confidential.

2) IBPC-NS contract staff is obliged to protect and not disclose to outsiders confidential information and data related to employees, partners or collaborators and non-public information, such as the institution's databases or data and information from other partner institutions.

3) Employees who have access to confidential information are prohibited from allowing access to data or material not intended for public use to persons inside or outside the institution without the consent of the IBPC-NS management.

4) The transmission of public information is done in compliance with the legislation on the provision of information of public interest.

Art. 30 Employment and hiring practices

(1) The institution undertakes to comply with labor legislation, to use fair employment practices, including the prohibition of all forms of discrimination.

(2) IBPC-NS undertakes to offer fair treatment to all its employees and to provide them with conditions and support to improve their professional training.

(3) The institution is committed to providing a team-working environment and promotes values.

(4) IBPC-NS undertakes to make decisions regarding employment, promotion exclusively for the benefit of the institution, on the basis of professional training, achievements, individual conduct, in compliance with the legislation in force.

(5) The institution undertakes to respect the confidentiality of employees' personal data and not to disclose them without their consent to persons or institutions that do not have the necessary authority to hold them.

(7) IBPC-NS contract staff may not be compelled to violate the legal provisions, values, policies and principles of the institution or this Code of Ethics and Integrity in Scientific Research.

Art. 31 Conduct of IBPC-NS staff

(1) Within the Institution, all activities must be carried out in a professional and professional manner and in accordance with this Code of Ethics and Integrity in Scientific Research, the Institution's internal regulations and legal provisions.

(2) The contractual staff of IBPC-NS has the obligation to respect the hierarchy established by the Rules of Organization and Functioning, the organizational chart approved at the level of the institution and the job description.

CHAPTER V. RULES OF GOOD CONDUCT IN RESEARCH, DEVELOPMENT AND INNOVATION

Art. 32. (1) ***The rules of good conduct in research, development and innovation (RDI) activity,*** as provided for in art. 2 and 2' of Law no. 206/2004 and art. 50 of Law no. 183/2024 on research ethics, are applicable to IBPC-NS employees and include:

a) rules of good conduct in the work of the CDI;

b) rules of good conduct in the activity of scientific communication, publication, dissemination and popularization, including in relation to applications for funding submitted in the framework of project competitions organized from public funds;

c) the rules of good conduct in the activity of institutional evaluation and monitoring of RDI, evaluation and monitoring of RDI projects obtained through actions within the National Plan for Research, Development and Innovation and evaluation of persons for the purpose of awarding degrees, titles, positions, awards, distinctions, distinctions, bonuses, attestations or certificates in the RDI activity;

d) rules of good conduct in management positions in the work of CDI;

e) the rules of good conduct regarding respect for human beings and human dignity, the avoidance of animal suffering and the protection and restoration of the natural environment and ecological balance;

f) rules of good conduct in the work of ethics committees of research organizations.

(2) The breaches of the rules of good conduct set out in Article 32 para. (1) letter a) of this Code, insofar as they do not constitute offenses under criminal law, include:

a) the fabrication of results or data and their presentation as experimental data, as data obtained by calculation or numerical computer simulation, or as data or results obtained by analytical calculation or deductive reasoning;
b) falsifying experimental data, data obtained by calculation or numerical computer simulation or data or results obtained by analytical calculation or deductive reasoning;
c) deliberately obstructing, hindering or sabotaging the RDI work of others, including by unreasonably blocking access to RDI facilities by damaging, destroying or tampering with experimental apparatus, equipment, documents, computer programs, electronic data, organic or inorganic substances or living matter necessary for others to conduct, perform or complete RDI activities;
d) obstructing the work of an ethics committee, a review committee or the National Council for Ethics in Scientific Research, Technological Development and Innovation (CNECSDTI), in the course of a review of misconduct in the work of the subordinate RDI;
e) failure to comply with the legal provisions and procedures intended to comply with the rules of good conduct in the activity of the CDI provided by Law no. 183/2024 and Law no. 199/2023, with subsequent amendments and additions, in the Code of Ethics, in the codes of ethics by fields, in the regulations of organization and functioning of research organizations, respectively in the university charters, as appropriate, including failure to implement the sanctions established by the ethics committees or by the CNECSDTI.
f) Contradictory data, differences in experimental design or practice, differences in interpretation of data, differences of opinion are factors specific to RDD activities and do not constitute misconduct in research.

(3) Breaches of the rules of good conduct provided for in Article 32 para. (1) letter b) of this Code, insofar as they do not constitute offenses under criminal law, include:
a) plagiarism;
b) self-plagiarism;
c) the inclusion in the list of authors of a scientific publication of one or more co-authors who have not contributed significantly to the publication or the exclusion of co-authors who have contributed significantly to the publication;
d) the inclusion in the list of authors of a scientific publication of a person without his/her consent;
e) unauthorized publication or dissemination by authors of unpublished scientific results, hypotheses, theories or methods;
f) False information relating to RDI activity in applications for grants or funding, in applications for habilitation, or in applications for competitions or examinations for research, development and innovation posts.

(4) Breaches of the rules of good conduct set out in Article 32 para. (1) lit. c) of this Code, insofar as they do not constitute offenses under criminal law, include:
a) non-disclosure of conflicts of interest or incompatibilities in carrying out or participating in evaluations;
b) assessment fraud;
c) failure to respect confidentiality in the evaluation;

d) discrimination in assessments on grounds of age, ethnicity, gender, social origin, political or religious orientation, sexual orientation or other types of discrimination.

(5) Breaches of the rules of good conduct provided for in Article 32 para. (1) letter d) of this Code, insofar as they do not constitute offenses under criminal law, include:

a) abuse of authority in order to obtain authorship or co-authorship of publications by subordinates;

b) abuse of authority in order to obtain salary, remuneration or other material benefits from RDI projects run or coordinated by subordinates;

c) abuse of authority in order to obtain authorship or co-authorship of the publications of subordinates or to obtain salaries, remuneration or other material benefits for spouses, relatives or relatives up to and including the third degree;

d) abuse of authority to unjustifiably impose their own theories, concepts or results on subordinates;

e) obstructing the work of an ethics committee, a review committee or the CNECSDTI in the course of a review of misconduct in the work of the CDI under his/her subordination;

f) failure to comply with the legal provisions and procedures intended to comply with the rules of good conduct in the activity of the CDI provided by Law no. 183/2024 and Law no. 199/2023, with subsequent amendments and additions, in the Code of Ethics, in the codes of ethics by fields, in the regulations of organization and functioning of research organizations, respectively in the university charters, as appropriate, including failure to implement the sanctions established by the ethics committees or by the CNECSDTI.

(6) Deviations from the rules of good conduct set out in Article 32(1)(e) of this Code of Ethics are detailed in the codes of ethics by domain.

a) CDI staff have responsibilities under the relevant legislation and professional codes of ethics in research on human subjects, in the use of animals for experimentation and in environmental protection.

b) CDI must be carried out with respect for the human being and human dignity, as well as for animal suffering, which must be prevented or minimized.

c) Good conduct in CDI is ensured in accordance with international regulations in the field, with the European Union legislation and with the ethical rules of its scientific research programs.

d) The ethical evaluation of RDI projects, which is carried out by the Ethics Commission together with technical experts or evaluation committees with relevant knowledge in the field, will necessarily include verification of the compliance of the projects with:

i) generally applicable ethical regulations concerning the protection of the human person, the use of human embryos and other human biological samples, the use of personal data for biobanks, including gene banks, the use for clinical trials of persons (individuals or population) who cannot consent, in particular children, pregnant women, healthy volunteers, the protection of personal data of research subjects;

ii) protection of animals, including transgenic animals and non-human primates;

iii) protection of the environment, good conduct in RDI must be carried out with the protection and restoration of the natural environment and ecological balance, ensuring their protection from possible aggressions produced by science and technology.

iv) the specific national and international ethical rules applicable to the research, which must be explicitly specified in the project.

(7) The following also constitute violations of the Code of Ethics by association for misconduct in research and development:

a) Knowing about the misconduct of others and not notifying the Ethics Committee or the CNECSDTI;

b) co-authoring publications containing falsified or fabricated data;

c) failure to comply with legal and contractual obligations, including those related to the contract of mandate or grant contracts, in the exercise of management or coordination functions for the activities of the CDI.

(8) Serious breaches of good conduct in the activity of the CDI, according to art. 52 para. 8 of Law no. 183/2024:

a) plagiarizing the results or publications of other authors;

b) fabrication of results or replacing results with fictitious data;

c) False information in grant or funding applications.

Art. 33 Contradictory data and information, differences in experimental design or practice, differences in the interpretation of data, differences of opinion are factors specific to the work of the CDI and do not constitute misconduct, as long as they do not violate the above-mentioned principles of good conduct.

CHAPTER VI. APPLICATION OF THE CODE OF ETHICS

Art. 34. Implementation of the Code of Ethics

(1) The provisions of this Code of Ethics shall be brought to the attention of IBPC-NS staff, by posting it on the IBPC-NS website and as follows:

- for existing staff - by the hierarchical heads;
- for new employees, by the Human Resources Office, before starting work.

(2) Any amendment to the content of this Code of Ethics shall be subject to the procedure for informing contract staff as specified in Article 34 para. 1.

Art. 35. Responsibilities of IBPC-NS contract staff

(1) Each employee has a duty to know and comply with the Code of Ethics, internal rules, procedures and regulations.

(2) In the event of a difference of opinion, a disagreement between two or more employees of the institution, it is advisable for the persons concerned to show maturity, to discuss openly, to analyze the problem, to determine its causes and to find together a way to resolve it so that it does not degenerate into a conflict. If the persons involved do not find an amicable solution or do not want an impartial opinion on the matter, they should contact the institution's Ethics Officer.

(3) Any employee who raises in good faith a concern regarding a possible violation of this Code of Ethics, legal provisions, regulations, IBPC-NS internal rules, or any behavior as illegal or unethical, shall be protected against any attempt to sanction or retaliate. Retaliation of any kind will result in disciplinary action being taken against the offenders. The same measures will also be taken in relation to persons who have intentionally provided false information in the case of referral.

(4) Contract staff who negligently or in bad faith violate this Code of Ethics must be aware that they are seriously damaging the institution, its employees and the image of IBPC-NS.

Art. 36 Reporting violations of the Code of Ethics and reporting fraud

(1) The institution may be contacted in writing by any individual, body or organization that has found a breach of ethics by an employee of IBPC-NS.

(2) Any person in a managerial position within IBPC-NS who receives a report of a breach of the rules of ethics is obliged to refer it to the Ethics Officer for review.

(3) IBPC-NS contract staff may submit, under conditions that ensure the confidentiality of their identity, complaints or claims, made in good faith, concerning an act of an employee that involves a violation of the law, internal rules of ethics and integrity, without fear of dismissal or retaliation of any kind.

(4) Any employee of the IBPC-NS who has knowledge, information or reasonable grounds indicating the existence of fraud or other forms of violation of the rules of ethics and professional conduct has the duty to immediately bring this information to the attention of the Ethics Officer.

(5) Ethical issues arising within the institution will be brought to the attention of the Ethics Officer, who is responsible for advising and/or assisting employees in complying with the rules of conduct in this Code of Ethics.

(6) Each employee may seek advice and/or assistance from the Ethics Officer on any matter falling within the scope of his/her duties.

Art. 37

(1) The facts which are the subject of the complaints, but not limited to:

a) compliance with laws, codes, regulations, internal rules, procedures and procedures on ethics and integrity;

b) coercion or threatening an employee to induce him or her to violate the legal provisions in force or to apply them improperly;

c) preferential or discriminatory treatment or practices in the exercise of their duties;

d) conflict situations with hierarchical superiors or colleagues which cannot be resolved amicably;

e) violation of incompatibilities and conflicts of interest;

f) violations of procedures or establishing internal procedures/standards in violation of the law;

g) acts of corruption as defined by criminal law.

(2) Complaints concerning breaches of the rules of good conduct in the work of the CDI are dealt with in two stages detailed in the Code of Ethics:

a) analysis at the level of the research organization within which the alleged misconduct occurred, referred to as the first stage, which is carried out in accordance with Art. 62 para. (3) of Law 183/2024 and the provisions of the Code of Ethics;

b) analysis at the level of the CNECSDTI, referred to as the second stage, which is carried out in accordance with Art. 55 paras. (3) - (8) of Law 183/2024.

Art. 38

(1) Referrals to the Ethics Commission can be made in the following ways:

- in an envelope or by e-mail to the IBPC-NS Ethics Advice Officer;
- transmission by post, to the IBPC-NS Secretariat, for the attention of the IBPC-NS Ethics Commission; after registration in the general register at the Institute's Secretariat, the envelopes are sent unopened to the Ethics Officer;
- ex officio, by self-referral;

(2) Anonymous complaints will not be considered.
(3) Complaints registered with the IBPC-NS Secretariat and sent to the IBPC-NS Ethics Commission may not be distributed in writing and/or electronically to third parties.

Art. 39
(1) The referral/complaint will be considered by the Ethics Officer who will determine the appropriate course of action, including the initiation of an investigation. Depending on the circumstances, the Ethics Officer will recommend, as appropriate, that the case be dealt with by ethics counseling or referred to the Ethics Committee from among whose members he/she may appoint a review panel, subject to Article 23 aimed at avoiding conflict of interest.
(2) Complaints/complaints are settled in accordance with Art. 62 para. (3) of Law no. 183/2024 by the review committee through a report drawn up within 60 days from the date of receipt of the complaint, endorsed by the institution's legal advisor and approved by the Ethics Commission within 30 days from the receipt of the review committee's report, shall be communicated in writing to the Director of IBPC-NS, the complainant as well as the persons concerned by the referral, is registered in the IBPC-NS general register and is made public on the research organization's website within 10 calendar days from the date of the final decision of the Ethics Commission by non-contest to the CNECSDTI or from the date of the final decision of the CNECSDTI, by which the appeal against the report approved by the Ethics Commission has been settled, or from the date of the final judgment of the court of law, by which the application for administrative appeal has been settled, with the aim of annulling the report approved by the Ethics Commission and/or the CNECSDTI decision by which the appeal against the report approved by the Ethics Commission has been settled, as the case may be.
(3) If the Review Commission considers that disciplinary offenses have been committed, the Ethics Commission informs the IBPC-NS management, which will order, in accordance with the law and internal regulations, the establishment of a disciplinary investigation committee to conduct a preliminary disciplinary investigation.

Art. 40
(1) The Ethics Committee and the review panel shall keep the identity of the complainant confidential.
(2) The report of the analysis committee, endorsed by the institution's legal advisor and approved by the Ethics Committee, is published on the institution's website with anonymization of all personal data in order to comply with the GDPR Regulation - protection of individuals with regard to the processing of personal data and on the free movement of such data.
(3) IBPC-NS is legally responsible for the decisions and the work of the review panel.
(4) The report of the analysis committee may be contested at the CNECSDTI by the person or persons found guilty or by the author of the complaint; the contestation must contain a simple copy of the initial complaint and of the report of the analysis committee.
(5) If an appeal has not been submitted to the CNECSDTI within 20 working days from the date of communication, the sanctions established by the review committee shall be implemented by the head of the institution within 60 calendar days from the date of communication of the report, according to Art. (9) of Law 183/2024.

Art. 41 Liability and sanctions
(1) Violation by IBPC-NS contract staff of the rules of conduct set out in this Code of Ethics constitutes disciplinary misconduct and may also entail disciplinary liability under the Labor Code and the Internal Rules.
2) The following situations may also attract sanctions:

a) Actions or inactions that violate the provisions of the Code of Ethics and other internal regulations of IBPC-NS: Internal Regulations, by-laws, decisions, rulings, decisions, etc.;
b) Causing other persons to violate the provisions of this Code of Ethics, other internal regulations or legislation applicable to the institution;
c) Actions against employees who have reported breaches of the Code of Ethics;
d) False statements, misleading or intentionally omitting aspects, data and information in front of supervisory and control/investigation authorities or bodies, including internal ones (internal audit, Disciplinary Committee), as well as in the media, and which implicitly lead to damage to the employee's assets or image, are grounds for disciplinary sanction of employees, including possible termination of the individual employment contract, in accordance with the applicable legislation and internal regulatory acts in force.
3) The reporting of violations of the law by IBPC-NS employees, provided by law as disciplinary offenses, misdemeanors or offenses, constitutes a warning in the public interest and concerns the following:
a) Corruption offenses, offenses assimilated to corruption offenses, offenses directly related to corruption offenses, forgery offenses and offenses related to or inconnection with service;
b) Preferential or discriminatory treatment or practices in the performance of duties;
c) Infringement of incompatibilities and conflicts of interest;
d) Misuse of material or human resources;
e) Breaches of the law on access to information and transparency of decision-making;
f) Infringement of legal provisions on public procurement and grants;
g) Incompetence or negligence;
h) Violations of administrative procedures or establishing internal procedures in violation of the law and/or internal regulations;
i) Issuing administrative or other acts contrary to the interests of the institution;
j) Maladministration or fraudulent mismanagement of the institution's public and private assets;
k) Infringement of any legal provisions/internal decisions requiring compliance with the principle of good administration and protection of the public interest;
4) Enforcement sanctions no remove liability civil criminal, material or infringement, as the case may be.

Art. 42
(1) If the Ethics Committee of the IBPC-NS finds that there has been a breach of good conduct in the work of the CDI, its members shall determine one or more sanctions as appropriate.
2) The sanctions that may be established by the Ethics Commission of the IBPC-NS for misconduct in the activity of the CDI are the following, according to art. 62 of Law no. 183/2024:
a) Written warning;
b) Definitive withdrawal and/or correction of all works published in violation of the rules of good conduct;
c) Reduction of basic salary by a maximum of 20%, for a maximum period of 6 months, cumulated, where appropriate, with the management, guidance and supervisory allowances and the allowances related to the CDI function;
d) Suspension, for a fixed period of between one and five years, of the right to sit an examination or to take a competition for higher professional qualifications or to obtain a higher

a management, guidance and supervisory function or as a member of an examination or competition board;
e) Removal from the leadership position in the research organization;
f) Disciplinary termination of the individual employment contract.
(2) For the deviations from good conduct in the RDI activity of the RDI staff benefiting from public RDI funds, found and proven, depending on the seriousness of the facts and the previous commission of similar facts, the CNECSDTI may propose the application of one or more of the following sanctions, according to art. 59 of Law no. 183/2024:
a) the withdrawal of the CDI professional grade obtained as a result of a breach of the rules of good conduct, established by the competent administrative court, following an application to that court for annulment of the administrative act by which the CDI professional grade was awarded;
b) Removal from the research organization's management position/membership on the ethics committee;
c) ban, for a fixed period, access to public funding for RDI activities;
d) exclusion of the person(s) concerned from the project implementation team;
e) stop project funding;
f) the termination of project funding, with the obligation to return the funds.

CHAPTER VII. CONTROL AND MONITORING OF THE APPLICATION OF CONDUCT RULES

Art. 43
1) The coordination and control of the application of the rules laid down in this Code of Ethics is carried out by the Ethics Commission of the IBPC-NS, which operates within the Scientific Council of the IBPC-NS, in accordance with art. 60, para. (2) of Law no. 183/2024.
2) The Ethics Commission is established by decision of the Director of the IBPC-NS, at the proposal of the Scientific Council, in accordance with art. 60 para. (3) of Law no. 183/2024.
3) The Ethics Commission has the following tasks:
a) It monitors within the institution the observance of the specific ethical rules of the field, according to art. 10 letter a of Law no. 206/2004, with the amendments brought by Law no. 183/2024;
b) It analyzes the proposals of the Ethics Officer on avoiding breaches of principles and rules of conduct and orders measures to remove causes, mitigate risks and vulnerabilities;
c) It analyzes complaints submitted by the Ethics Officer;
d) Appoints review committees to examine the complaints related to misconduct in the activity of the CDI brought to their attention following referrals or on the basis of self-reporting according to art. 10 lit. b of Law 206/2004, with the amendments brought by Law no. 183/2024;
e) Analyzes the complaints received from the employees and the management of IBPC-NS regarding the violation of legal regulations, possible actions of discrimination, corruption, etc.;
f) It examines the validity of complaints/complaints in terms of the provisions of the Code of Ethics and Integrity and reports on each individual case;
g) Formulates proposals to amend/complement this Code of Ethics.

Art. 44
1) Monitoring the application of the rules of this Code of Ethics is carried out by the Ethics Officer, appointed by decision of the Director of IBPC-NS.
2) The Ethics Officer shall exercise the following duties:

a) It monitors the application and observance of the principles and rules of conduct by the institution's employees set out in the Code of Ethics;
b) Giving ethical advice to the staff of the institution on compliance with the rules of conduct, in written or verbal form, depending on the means of solicitation;
c) Informs employees about ethics rules, changes in the legislative and regulatory framework in the field of ethics and integrity;
d) Signalizes institutional practices or procedures that could lead to the violation of principles and rules of conduct in the work performed by employees;
e) It analyzes complaints and grievances made by employees of the institution or by other persons concerning staff conduct and makes general recommendations, without interfering in the work of the Ethics Committee or Disciplinary Committees;
f) He/she organizes, as often as he/she deems necessary, meetings with heads of departments and/or employees for the purpose of training and/or resolving ethical dilemmas;
g) Produces periodic, semi-annual/annual Reports which are presented to the Scientific Council of IBPC-NS.
3) The Ethics Officer is required to respect the confidentiality of information to which he/she has access in the performance of his/her duties.

CHAPTER VIII. FINAL PROVISIONS

Art. 45
1) This Code of Ethics is applied in accordance with the provisions of the Law no. 183/2024 on the status of the CDI staff, the Order no. 652/09.08.2005 of the Director of the Institute of Cell Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" and the Code of Ethics of the field "life sciences", elaborated by the National Council of Ethics.
2) This Code shall enter into force on the date of approval by the Scientific Council of the IBPC-NS and shall take effect from the date on which it is brought to the attention of the staff of the institution.
3) Once approved, the Code will be disseminated by e-mail to all departments within IBPC-NS, through the Human Resources-Salary Office and will be posted on the institution's website and in the IBPC-NS library.
4) Each employee shall be deemed to have become aware of the contents of the Code of Ethics upon its e-mailing and posting on the IBPC-NS website. From that moment on, the employer's obligation to inform staff of the content of the Code of Ethics is deemed to have been fulfilled and none of the employees may invoke ignorance of these provisions.
5) Heads of Departments shall take all necessary steps to ensure that their staff are aware of and comply with the provisions of this Code of Ethics.

Art. 46

1) This Code of Ethics may be amended whenever necessary as a result of changes in the relevant legislation and the complexity of the RDI activities carried out by IBPC-NS staff.
2) Proposals for amendments and/or additions to this Code of Ethics may be made by any person within IBPC-NS and shall be submitted in writing to the Ethics Officer.
3) Amendments/additions to the Code of Ethics will be subject to review by the Ethics Committee and the Scientific Council and, if appropriate, will be subject to updating/revision.
4) Amendments/additions to this Code of Ethics will be brought to the attention of all IBPC-NS employees by the Ethics Officer.

Art. 47

1) The provisions of this Code of Ethics are complemented by the provisions of the Internal Rules, operational procedures and any other related internal acts.
2) The rules of conduct and integrity of IBPC-NS employees, set out in this Code of Ethics are not limitative, but are complemented by those contained in the legal provisions.
3) The provisions of this Code of Ethics are not limitative; any other special provisions on the subject are applicable to the categories of employees to which they are addressed.

DIRECTOR

Acad. Maya Simionescu

Componentele principale ale proiectului:

A. Reabilitarea constructiilor si instalatiilor

Reabilitarea structurala a cladirii de laboratoare, termoizolarea cladirii pentru imbunatatirea performantei energetice, modernizarea suprafetelor construite, a tuturor instalatiilor functionale (ventilatii, climatizari, termice, sanitare, electrice curenti tari si slabi) care sa asigure conditiile unei functionări optime a echipamentelor si aparaturii de cercetare, precum si recompartimentari ce au condus la extinderea spatiilor dedicate cercetarii;

B. Dotari cu echipamente de C-D de inalta performanta

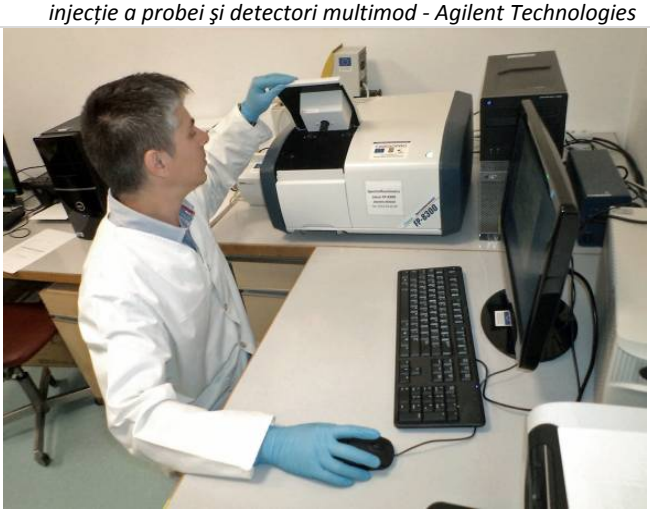
Achizitia a peste 150 echipamente si aparate de C-D, si alte dotari de înaltă performanță, la nivelul standardelor de cercetare ale UE, care au intrat in dotarea celor 13 laboratoare noi infiintate si a laboratoarelor existente, in sprijinul noilor directii de cercetare in cardio-diabetologie.

⇨ *Lipidomica*

Sistem complet gaz cromatograf cu autoinjector şi detectori, cuplat cu spectrometru de masă - Agilent Technologies

Cromatograf lichid de înaltă performanță (UHPLC) cu sistem de injecție a probei şi detectori multimod - Agilent Technologies

Sistem pentru cromatografie lichidă rapidă pentru proteine (FPLC), cu detector UV şi colector de fracțiuni - GE Healthcare



Spectrofluorimetru - ABL&E-Jasco

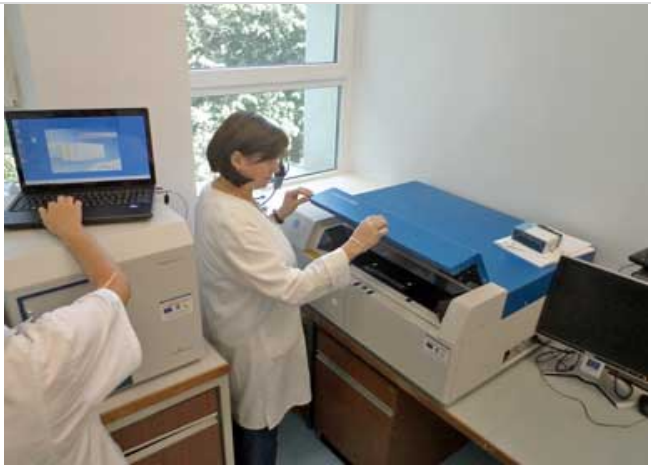
Sistem Real-Time PCR ViiA7 - Applied Biosystems

Aparat pentru preluare imagini in flluorescenta, luminiscenta, UV si vizibil LAS-4000 - GE Healthcare

⇨ Proteomica

Sistem spectrometrie de masa - Thermo Scientific

Spectrofotometru de mare performanta cu capabilitati de fluorescenta si luminiscenta - BMG Labtech



Typhoon FLA 9500 high performance variable mode laser scanner - GE Healthcare

Sistem de nanocromatografie de lichide Easy Nano LC II, Thermo Scientific

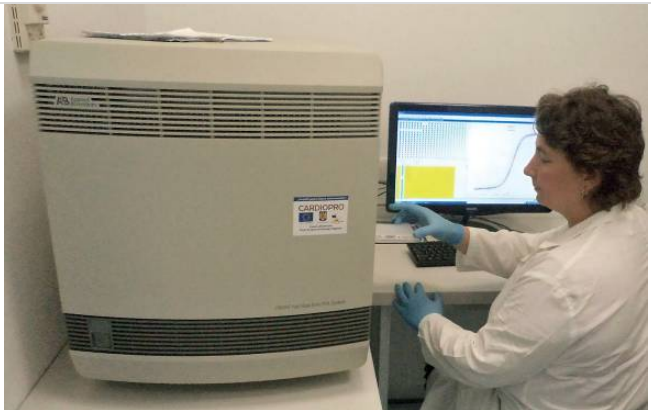
Sistem automat de excizare spoturi - Bio-Rad

Sisteme de mare performanta pentru electroforeza bidimensionala - GE Healthcare / Bio-Rad

⇨ Genomica-transcriptomica si terapie moleculara

Aparat pentru pirosecventiere - Qiagen

Statie de pipetare - Qiagen



Real Time PCR - Applied Biosystems

Real-time PCR thermocycler LightCycler 480II- Roche

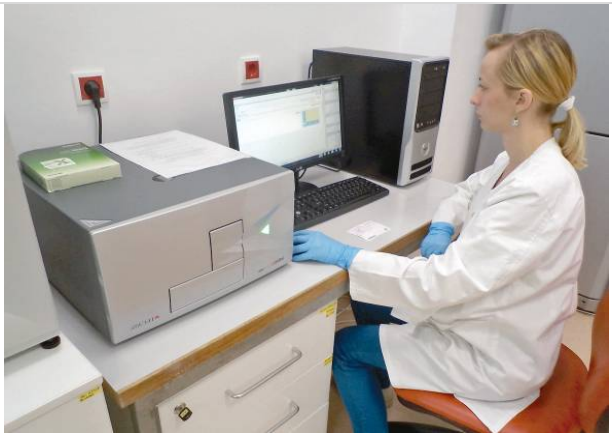
Microscop optic inversatde fluorescenta, Carl Zeiss

Sonicator Bioruptor Plus - Diagenode

⇨ Patofiziologie si farmacologie

Sistem microdisectie cu laser Zeiss

Echipament complex pentru miografie izometrica - DMT



Spectrofotometru pentru microplaci - TECAN

Echipament de PCR conventional (thermocycler) - Applied Biosystems

⇨ Biopatologia si terapia inflamatiei

Sistem adeziune in flux laminar - OLYMPUS

Hote cu flux laminar - Euroclone

⇨ *Medicina regenerativa in terapii celulare*

Citometru de flux - Beckman Coulter

Analizor automat de biochimie, Randox

Microscop inversat - Nikon

Sistem Millar pentru masurarea functiei cardiace prin determinarea concomitenta a presiunii si volumului cardiac

Microscop de fluorescenta, inversat, de cercetare - Zeiss

Vibratom automat - Leica

Dotarile pentru facilitatile comune departamentelor de cercetare din Institut:

⇨ *IMAGISTICA*

Ultramicrotom EMUC7 cu sistem de sectionare la temperatura joasa EMFC7 - Leica

Sistem confocal - Leica

Ecograf pentru animale mici Vevo 2000- Visualsonic

Sistem tomograf pentru animale mici de laborator IVIS SPECTRUM - Caliper

⇨ LABORATORUL CENTRAL CULTURI CELULARE

Camere curate cu diferite clase de curatenie

⇨ PLATFORMA DE MODELARE EXPERIMENTALA

Rack-uri ventilate cu custi pentru animale mici de laborator, Allentown

Hota biologica de securitate si transfer de animale – ALLENTOWN,
Izolator de transfer mobil 2 manusi - EuroBioConcept

C. Intarirea capacitatii administrative si institutionale

Aceasta componenta a avut in vedere:

- definirea nivelului si rolului Institutului ca actor pe piața internațională a cunoaşterii şi mobilizarea resurselor Institutului de colaborare cu firmele în domeniu;
- introducerea si aplicarea conceptelor privind managementul cercetării;
- practici si metode de valorificare a potentialului de colaborare si participare la rețele naționale şi internaționale, inclusiv acces la instrumente financiare, care să asigure masa critică şi obținerea de rezultate valoroase ale cercetarii la nivel internațional;
- continua evaluare a performanței cercetării.

A fost elaborata Strategia privind dezvoltarea institutionala a IBPC-NS pentru perioada 2012-2015

COMUNICAT DE PRESĂ

PNRR: Fonduri pentru România modernă și reformată!

LANSAREA PROIECTULUI FIBROTHERA:
Noi perspective terapeutice în fibroza cardiacă post-infarct

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, institut în subordinea Academiei Române, cu sediul în București, str. B.P. Hasdeu, nr. 8, cod postal 050568, sector 5, România, în calitate de beneficiar, anunță lansarea proiectului „***Țintirea fibrozei cardiace în insuficiența cardiacă; provocări și soluții potențiale bazate pe terapia cu ncARN – FIBROTHERA***”, Cod Proiect PNRR-III-C9-2022-I8-186, Contract finanțare nr. 760062/23.05.2023, finanțat prin Planul Național de Redresare și Reziliență al României.

Proiectul va fi implementat în perioada **01 iulie 2023 – 30 iunie 2026**, la sediul Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” din București, sub coordonarea Dr. Fabio Martelli.

Valoarea totală a proiectului a fost de 7.652.177 lei

FIBROTHERA va avea ca obiectiv major dezvoltarea unei direcții avansate de cercetare dedicate înțelegerii și țintirii fibrozei cardiace asociate insuficienței cardiace după infarct miocardic. Proiectul își propune să investigheze mecanismele celulare și moleculare implicate în dezvoltarea fibrozei cardiace și să identifice noi ținte terapeutice bazate pe ARN-uri necodificatoare. Prin integrarea unor modele experimentale relevante, a analizelor moleculare avansate și a strategiilor de validare funcțională, proiectul urmărește să contribuie la o mai bună înțelegere a remodelării cardiace patologice și la dezvoltarea unor abordări inovatoare pentru prevenirea și tratamentul insuficienței cardiace.

Detalii suplimentare se pot obține de la:
Nume persoană contact: Dr. Alexandrina Burlacu
Funcție: Cercetător științific grad I, Responsabil științific de proiect FIBROTHERA
Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”
Tel.: 021.319.45.18, e-mail: sanda.burlacu@icbp.ro

”Conținutul acestui material nu reprezintă în mod obligatoriu poziția oficială a Uniunii Europene sau a Guvernului României”

COMUNICAT DE PRESĂ

PNRR: Fonduri pentru România modernă și reformată!

Finalizarea proiectului THERAGENLIV: Noi tratamente pentru boala ficatului gras non-alcoolic (NAFLD)

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu" a finalizat cu succes proiectul „***Îmbunătățirea potențialului endogen anti-oxidant și de îndepărtare a colesterolului prin editare genică în boala ficatului gras; studii pre-clinice***", Acronim **THERAGENLIV**, cod proiect PNRR-III-C9-2022-I8-197, contract nr. 760059/23.05.2023, finanțat prin Planul Național de Redresare și Reziliență al României.

Proiectul a fost implementat în perioada **1 iulie 2023 – 30 iunie 2026**, la sediul Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu" din București, de către membrii departamentului Lipidomică, sub coordonarea Prof. Shlomo Sasson.

Valoarea totală a proiectului a fost de **7.000.000 lei** (1.417.290,94 euro).

THERAGENLIV a avut ca obiectiv major dezvoltarea de noi tratamente pentru boala ficatului gras non-alcoolic (NAFLD), care se dezvoltă prin acumularea de lipide în hepatocite și afectează funcționarea ficatului. NAFLD este asociată cu obezitatea, dislipidemia și rezistența la insulină, factori de risc pentru diabetul zaharat de tip 2, 75% dintre pacienții diabetici având NAFLD. **Scopul principal** al proiectului THERAGENLIV a fost ameliorarea NAFLD prin utilizarea tehnologiei inovatoare CRISPR/dCas9 pentru a supra-exprima enzimele antioxidante proprii (SOD1, GCL/GR) sau transportatorii de eflux de colesterol (ABCG5/8) în enterocite și hepatocite.

Echipa de implementare a utilizat tehnologia de activare CRISPR/dCas9 pentru demonstrarea potențialului celulelor manipulate de a îmbunătăți comunicarea metabolică dintre hepatocite, enterocite și celulele-β pancreatice sau celulele endoteliale vasculare. **Rezultatele** proiectului vor ajuta la dezvoltarea de terapii genice inovatoare specifice celulei/țesutului pentru un management mai bun al stresului oxidativ și inflamator, precum și descărcării lipidice în NAFLD și diabetul de tip 2, boli cu impact socio-economic major.

Prin rezultatele obținute, proiectul THERAGENLIV contribuie la consolidarea cercetării translaționale în domeniul bolilor metabolice și oferă o bază științifică pentru dezvoltarea unor strategii terapeutice inovatoare în NAFLD și diabetul de tip 2.

Detalii suplimentare se pot obține de la:

Persoană de contact: Acad. Anca V. Sima

Funcție: Cercetător Științific Gr. I, Coordonator științific local

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu"

Tel.: 021.319.45.18, Fax: 021.319.45.19, e-mail: anca.sima@icbp.ro

"Conținutul acestui material nu reprezintă în mod obligatoriu poziția oficială a Uniunii Europene sau a Guvernului României"

PNRR. Finanțat de Uniunea Europeană – UrmătoareaGenerațieUE

Website – https://mfe.gov.ro/pnrr/ Facebook - https://www.facebook.com/PNRROficial

COMUNICAT DE PRESĂ

PNRR: Fonduri pentru România modernă și reformată!

Lansarea proiectului THERAGENLIV: Noi tratamente pentru boala ficatului gras non-alcoolic (NAFLD)

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu" lansează proiectul „***Îmbunătățirea potențialului endogen anti-oxidant și de îndepărtare a colesterolului prin editare genică în boala ficatului gras; studii pre-clinice***", Acronim **THERAGENLIV**, cod proiect PNRR-III-C9-2022-I8-197, contract nr. 760059/23.05.2023, finanțat prin Planul Național de Redresare și Reziliență al României.

Întâlnirea inaugurală (*Kick-off meeting*) va avea loc în data de **25 iulie 2023** la sediul Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu" din București.

Proiectul va fi implementat în perioada **1 iulie 2023 – 30 iunie 2026**, la sediul Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu" din București, de către membrii departamentului Lipidomică, sub coordonarea Prof. Shlomo Sasson.

Valoarea totală a proiectului este de **7.000.000 lei** (1.417.290,94 euro).

THERAGENLIV va avea ca obiectiv major dezvoltarea de noi tratamente pentru boala ficatului gras non-alcoolic (NAFLD), care se dezvoltă prin acumularea de lipide în hepatocite și afectează funcționarea ficatului. NAFLD este asociată cu obezitatea, dislipidemia și rezistența la insulină, factori de risc pentru diabetul zaharat de tip 2, 75% dintre pacienții diabetici având NAFLD. **Scopul principal** al proiectului THERAGENLIV este ameliorarea NAFLD prin utilizarea tehnologiei inovatoare CRISPR/dCas9 pentru a supra-exprima enzimele antioxidante proprii (SOD1, GCL/GR) sau transportatorii de eflux de colesterol (ABCG5/8) în enterocite și hepatocite.

Echipa de implementare va implementa tehnologia de activare CRISPR/dCas9 pentru demonstrarea potențialului celulelor manipulate de a îmbunătăți comunicarea metabolică dintre hepatocite, enterocite și celulele-β pancreatice sau celulele endoteliale vasculare. **Rezultatele** proiectului vor ajuta la dezvoltarea de terapii genice inovatoare specifice celulei/țesutului pentru un management mai bun al stresului oxidativ și inflamator, precum și descărcării lipidice în NAFLD și diabetul de tip 2, boli cu impact socio-economic major.

Prin rezultatele obținute, proiectul THERAGENLIV va contribui la consolidarea cercetării translaționale în domeniul bolilor metabolice și oferă o bază științifică pentru dezvoltarea unor strategii terapeutice inovatoare în NAFLD și diabetul de tip 2.

Detalii suplimentare se pot obține de la:

Persoană de contact: Acad. Anca V. Sima

Funcție: Cercetător Științific Gr. I, Coordonator științific local

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu"

Tel.: 021.319.45.18, Fax: 021.319.45.19, e-mail: anca.sima@icbp.ro

"Conținutul acestui material nu reprezintă în mod obligatoriu poziția oficială a Uniunii Europene sau a Guvernului României"

COMUNICAT DE PRESĂ

PNRR: Fonduri pentru România modernă și reformată!

Finalizarea proiectului FIBROTHERA: noi perspective terapeutice în fibroza cardiacă post-infarct

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, institut în subordinea Academiei Române, cu sediul în București, str. B.P. Hasdeu, nr. 8, cod postal 050568, sector 5, România, în calitate de beneficiar, anunță finalizarea proiectului „***Țintirea fibrozei cardiace în insuficiența cardiacă; provocări și soluții potențiale bazate pe terapia cu ncARN – FIBROTHERA***”, Cod Proiect PNRR-III-C9-2022-I8-186, Contract finanțare nr. 760062/23.05.2023, finanțat prin Planul Național de Redresare și Reziliență al României.

Proiectul a fost implementat în perioada **01 iulie 2023 – 30 iunie 2026**, la sediul Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” din București, sub coordonarea Dr. Fabio Martelli.

Valoarea totală a proiectului a fost de 7.652.177 lei

FIBROTHERA a avut ca **obiectiv major** dezvoltarea unei direcții avansate de cercetare dedicate înțelegerii și țintirii fibrozei cardiace asociate insuficienței cardiace după infarct miocardic. Prin rezultatele obținute, FIBROTHERA contribuie la consolidarea cercetării translaționale în domeniul bolilor cardiovasculare ischemice și oferă o bază științifică pentru dezvoltarea unor strategii terapeutice inovatoare în insuficiența cardiacă.

Rezultatele preconizate ale proiectului au fost obținute și au fost atinși **indicatorii asumați**, respectiv: Realizare website proiect **/** Kick-off meeting **/** Publicații științifice rezultate din proiect (numar articole ISI) = 20 **/** Număr proiecte depuse la competiții Orizon Europa = 2 **/** Număr doctoranzi angajați in proiect (echivalent normă intreagă) = 2 **/** Număr cercetători post-doctorali angajați in proiect (echivalent normă intreagă) = 2 **/** Adoptarea Cartei europene a Cercetătorilor și a Codului de conduită pentru recrutarea cercetătorilor.

Detalii suplimentare se pot obține de la:

Nume persoană contact: Dr. Alexandrina Burlacu

Funcție: Cercetător științific grad I, Responsabil științific de proiect FIBROTHERA

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

Tel.: 021.319.45.18, e-mail: sanda.burlacu@icbp.ro

”Conținutul acestui material nu reprezintă în mod obligatoriu poziția oficială a Uniunii Europene sau a Guvernului României”

PNRR. Finanțat de Uniunea Europeană – UrmătoareaGenerațieUE

Website – https://mfe.gov.ro/pnrr/ Facebook - https://www.facebook.com/PNRROficial

COMUNICAT DE PRESĂ

„PNRR: Fonduri pentru România modernă și reformată!”

Anunț privind finalizarea proiectului cu titlul:

„Noi strategii nanoterapeutice care țintesc mecanismele implicate în tranziția fibroblast-miofibroblast pentru tratamentul fibrozei cardiace”

heartcure

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, institut în subordinea Academiei Române, cu sediul în București, str. B.P. Hașdeu, nr. 8, cod poștal 050568, sector 5, România, în calitate de beneficiar, anunță finalizarea proiectului „Noi strategii nanoterapeutice care țintesc mecanismele implicate în tranziția fibroblast-miofibroblast pentru tratamentul fibrozei cardiace – HeartCure”, Cod Proiect: PNRR-III-C9-2022-I8 CF 93/15.11.2022, Contract finanțare nr. 760063/23.05.2023, finanțat prin Planul Național de Redresare și Reziliență al României.

Perioadă de implementare: 1 iulie 2023 – 30 iunie 2026.

Valoarea totală cu TVA: 7.678.795,14 lei

Valoarea contribuției fără TVA: 7.000.000,00 lei

Obiectivul proiectului: Cercetarea mecanismelor fibrozei cardiace și dezvoltarea de terapii inovatoare

Rezultatele preconizate ale proiectului au fost obținute și au fost atinși indicatorii asumați, respectiv:

►Publicații științifice rezultate din proiect (număr articole ISI) = 16

►Număr de proiecte depuse la competiții Europene/ programul-cadru Orizont Europa = 6/ 4

►Număr de proiecte finanțate în programe Europene/ programul-cadru Orizont Europa = 3/ 2

►Număr doctoranzi angajați în proiect (echivalent normă întreagă) = 2

►Număr cercetători post-doctorali angajați în proiect (echivalent normă întreagă) = 2

►Directorul de proiect, specialist din străinătate, Prof. Rostyslav Bilyy, a fost angajat în proiect cu 75% din normă întreagă.

►adoptarea Cartei Europene a Cercetătorilor și a Codului de conduită pentru recrutarea cercetătorilor

Detalii suplimentare se pot obține la:
Persoana de contact: Dr. Manuela Călin
Funcție: Cercetător științific gradul I, Coordonator științific proiect HeartCure
Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”
Tel.: 021.319.45.18, Fax: 021.319.45.19, e-mail: manuela.calin@icbp.ro

”Conținutul acestui material nu reprezintă în mod obligatoriu poziția oficială a Uniunii Europene sau a Guvernului României”

COMUNICAT DE PRESA

PNRR: Fonduri pentru România modernă şi reformată!

Lansarea proiectului STROMA: ***Consolidarea competenței românești în cercetarea sindromului metabolic prin explorarea rolului apolipoproteinei A2 în dislipidemie, obezitate și diabet zaharat de tip II***

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu" anunță lansarea proiectului ***„Consolidarea competenței românești în cercetarea sindromului metabolic prin explorarea rolului apolipoproteinei A2 în dislipidemie, obezitate și diabet zaharat de tip II"***, acronim **STROMA**, cod proiect **PNRR-III-C9-2022-I8-258**, contract nr. **760060/23.05.2023**, finanțat prin **Planul Național de Redresare și Reziliență al României**.

Întâlnirea inaugurală (Kick-off meeting) va avea loc în data de **17 iulie 2023, ora 14:00**, în **Aula G.E. Palade** a Institutului de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu" din Bucureşti. În cadrul conferinței de lansare, coordonatorul proiectului, **Dr. Kyriakos Kypreos**, va prezenta proiectul, obiectivele și indicatorii propuși.

Proiectul se desfăşoară în perioada **1 iulie 2023 – 30 iunie 2026**, sub coordonarea **Dr. Kyriakos E. Kypreos** în Institutul de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu", fiind implementat de membrii laboratorului de *Reglare Genică și Terapii Moleculare.*

Valoarea totală a proiectului este de **7.000.000 lei** (respectiv **7.606.842,14 lei cu TVA**).

Proiectul **STROMA** își propune să elucideze modul în care apolipoproteina A2 influențează gestionarea grăsimilor și a glucozei în condiții de boală metabolică. Cercetările vor examina modul în care această proteină modifică traiectoria lipidelor în fluxul sanguin și modul în care alterează compoziția și funcționalitatea HDL**,** colesterolul „bun". În paralel, echipa de cercetare va analiza modul în care apolipoproteina A2 afectează capacitatea organismului de a menține niveluri stabile ale glucozei și modul în care țesutul adipos stochează și mobilizează energia. Proiectul propune introducerea unor metodologii avansate şi extinderea expertizei instituționale, consolidând semnificativ potențialul de cercetare pe termen lung și capacitatea competitivă a institutului în domeniul cercetării cardiovasculare. Pe baza cunoștințelor dobândite, STROMA va avansa cercetarea translațională în domeniul bolilor metabolice și va crea o bază științifică solidă pentru dezvoltarea unor **strategii terapeutice** inovatoare adresate bolilor cardiovasculare.

Detalii suplimentare se pot obține de la:
Nume persoană contact: Dr. Anca Gafencu
Funcție: Cercetător Principal I, Coordonator științific local
Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu"
Tel.: 021.319.45.18, Fax: 021.319.45.19, e-mail: anca.gafencu@icbp.ro

COMUNICAT DE PRESĂ

„PNRR: Fonduri pentru România modernă și reformată!”

Lansarea proiectului HeartCure:

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, institut în subordinea Academiei Române, cu sediul în București, str. B.P. Hașdeu, nr. 8, cod poștal 050568, sector 5, România, în calitate de beneficiar, lansează proiectul „***Noi strategii nanoterapeutice care țintesc mecanismele implicate în tranziția fibroblast-miofibroblast pentru tratamentul fibrozei cardiace* – HeartCure**”, Cod Proiect: PNRR-III-C9-2022-I8 CF 93/15.11.2022, Contract finanțare nr. 760063/23.05.2023, finanțat prin Planul Național de Redresare și Reziliență al României.

Întâlnirea inaugurală (Kick-off meeting) va avea loc în data de 20 iulie 2023 la sediul Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” din București.

Proiectul va fi implementat în perioada **1 iulie 2023 – 30 iunie 2026**, la sediul Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” din București de către o echipă formată din membri ai departamentelor: Bionanotehnologii Medicale și Farmaceutice, Inflamație și Patofiziologie și Farmacologie Celulară. Director de proiect: Prof. Rostyslav Bilyy.

Valoarea totală a proiectului este de **7.000.000 lei** (1.417.290,94 euro).

HeartCure are ca obiectiv cercetarea mecanismelor fibrozei cardiace și dezvoltarea de terapii inovatoare. Fibroza cardiacă este implicată în majoritatea bolilor cardiovasculare, principala cauză de morbiditate și mortalitate la nivel mondial, afectând peste 60 de milioane de persoane în Uniunea Europeană și generând costuri anuale de aproximativ 210 miliarde de euro, ceea ce evidențiază impactul său major asupra sănătății publice, societății și economiei. **Scopul principal al proiectului** este investigarea mecanismelor care stau la baza comunicării dintre neutrofile și fibroblastele cardiace în procesul de tranziție fibroblast–miofibroblast (FMT) și dezvoltarea, respectiv validarea unei strategii nanoterapeutice inovatoare care să țintească aceste procese nou identificate, cu scopul de a inhiba FMT și de a preveni sau reduce fibroza cardiacă.

Detalii suplimentare se pot obține la:
Persoana de contact: Dr. Manuela Călin
Funcție: Cercetător științific gradul I, Coordonator științific proiect HeartCure
Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”
Tel.: 021.319.45.18, Fax: 021.319.45.19, e-mail: manuela.calin@icbp.ro

”Conținutul acestui material nu reprezintă în mod obligatoriu poziția oficială a Uniunii Europene sau a Guvernului României”

PNRR. Finanțat de Uniunea Europeană – UrmătoareaGenerațieUE

Website – https://mfe.gov.ro/pnrr/ Facebook - https://www.facebook.com/PNRROficial

Finanțat de Uniunea Europeană NextGenerationEU

MINISTERUL CERCETĂRII, INOVĂRII ȘI DIGITALIZĂRII

Planul Național de Redresare și Reziliență

COMUNICAT DE PRESĂ

- sesiune de prezentare a progresului implementării proiectelor PNRR -

București, 29.04.2025

Institutul de Biologie și Patologie Celulara "Nicolae Simionescu" anunță sesiunea de prezentare a progresului la mijlocul perioadei de implementare a celor 5 proiecte PNRR/2022/C9/MCID/I8, Contractele nr. 760059; 760060; 760061; 760062; și 760063, care va avea loc în:

Data: Marți, 29 Aprilie 2025
Ora: 11.00 AM
Locația: Institutul de Biologie si Patologie Celulara "Nicolae Simionescu"

În cadrul conferinței, coordonatorii proiectelor PNRR din partea IBPC "Nicolae Simionescu" vor prezenta progresul înregistrat în aceste proiecte privind rezultatele științifice și indicatorii de performanță asumați.

Finanțat de Uniunea Europeană NextGenerationEU

MINISTERUL CERCETĂRII, INOVĂRII ȘI DIGITALIZĂRII

Planul Național de Redresare și Reziliență

PRESS REALESE

Bucharest, 04.29.2025

We are pleased to announce that Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu will organize a dedicated session for the progress achieved during the mid-term implementation period of ongoing PNRR projects: PNRR/2022/C9/MCID/I8, Contract no. 760059; 760060; 760061; 760062; and 760063.

Date: Tuesday, 29 April
Time: 11.00 AM
Location: Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"

During the session, the PNRR project coordinators from IBPC "Nicolae Simionescu" will present the progress achieved within these projects, focusing on the scientific results obtained and the performance indicators committed.

Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"
Strada B. P Hașdeu, nr. 8, CP 35 – 14, București, România
Tel: (+4021) 319.45.18; 319.45.20; www.icbp.ro

COMUNICAT DE PRESA

PNRR: Fonduri pentru România modernă și reformată!

Finalizarea proiectului IMMUNOCARD: contribuţii la înţelegerea mecanismelor inflamatorii asociate afectării miocardice

Institutul de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” a finalizat cu succes proiectul *„**Dezvoltarea unei noi terapii imunomodulatoare împotriva inflamaţiei cardiace în infarctul miocardic, miocardită şi sepsis – IMMUNOCARD***”, cod proiect PNRR-III-C9-2022-I8-148, contract nr. **760061/23.05.2023**, finanţat prin Planul Naţional de Redresare şi Reziliență al României.

Perioada de implementare a proiectului a fost 1 iulie 2023 – 30 iunie 2026, la sediul Institutului de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” din Bucureşti, sub coordonarea M.D., Ph.D. Alexandru Șchiopu.

Valoarea totală a proiectului a fost de 7.722.000,000 lei.

Proiectul a urmărit investigarea mecanismelor prin care inflamația cardiacă excesivă contribuie la apariția leziunilor miocardice în infarctul miocardic, miocardită şi sepsis, afecțiuni caracterizate prin căi inflamatorii comune, cu impact asupra funcției cardiace.

Activităţile de cercetare s-au concentrat asupra implicării alarminei proinflamatoare S100A8/A9 în declanşarea mecanismelor patogene comune cardiomiopatiilor inflamatorii şi caracterizarea proceselor asociate afectării miocardice. Totodată, au fost investigate efectele inhibitorului ABR-238901 asupra acestor mecanisme, conturând direcții cu potențial terapeutic pentru limitarea progresiei către insuficiență cardiacă. La pacienții cu infarct miocardic, cercetările au urmărit caracterizarea răspunsului imun pe termen lung și identificarea unor profile imunologice asociate riscului de dezvoltare a insuficienței cardiace.

Prin studiile desfăşurate, proiectul IMMUNOCARD a extins cunoştinţele privind mecanismele inflamatorii implicate în afectarea miocardică şi a evidenţiat direcţii pentru dezvoltarea unor noi abordări imunomodulatoare pentru prevenirea progresiei către insuficienţă cardiacă în bolile cardiovasculare inflamatorii.

Detalii suplimentare se pot obține de la:

Nume persoană contact: Dr. Adrian Manea

Funcţie: Cercetător Principal, Coordonator ştiinţific local

Institutul de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

Tel.: 021.319.45.18, Fax: 021.319.45.19, e-mail: adrian.manea@icbp.ro

** Conținutul acestui material nu reprezintă în mod obligatoriu poziția oficială a Uniunii Europene sau a Guvernului României**

COMUNICAT DE PRESĂ

PNRR: Fonduri pentru România modernă și reformată!

Lansarea proiectului IMMUNOCARD:
Contribuții la înțelegerea mecanismelor inflamatorii asociate afectării miocardice

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” lansează proiectul „***Dezvoltarea unei noi terapii imunomodulatoare împotriva inflamației cardiace în infarctul miocardic, miocardită și sepsis***”, Acronim **IMMUNOCARD**, cod proiect PNRR-III-C9-2022-I8-148, contract nr. 760061/23.05.2023, finanțat prin Planul Național de Redresare și Reziliență al României.

Întâlnirea inaugurală (*Kick-off meeting*) va avea loc în data de **21 septembrie 2023** la sediul Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” din București.

Proiectul va fi implementat în perioada **1 iulie 2023 – 30 iunie 2026**, la sediul Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” din București, sub coordonarea Alexandru Schiopu, M.D., Ph.D.

Valoarea totală a proiectului este de **7.722.000,000** lei cu TVA.

Ipoteza de baza a proiectului IMMUNOCARD este că S100A8/A9 declansează mecanisme patogene comune in cardiomiopatiile inflamatorii. Scopul nostru experimental este de a caracteriza aceste mecanisme și de a dezvolta strategii de tratament capabile să previna insuficiența cardiacă. La pacienti cu infarct miocardic (IM) , ne propunem sa identificăm efectele pe termen lung asupra sistemului imunitar si să definim un tipar imunologic specific pacienților cu risc de a dezvolta insuficiența cardiacă.

Vom studia influența ABR asupra funcției cardiace, inflamației, funcției mitocondriale, modificarilor epigenetice, apoptozei cardiomiocitare și fibrozei în modele animale de IM, miocardita și cardiomiopatie septică. In vitro, vom examina activarea cailor inflamatorii, disfuncția mitocondrială și apoptoza declanșata de S100A8/A9 în cardiomiocite, macrofage și fibroblasti. Într-o cohortă de pacienți cu IM, vom analiza formarea autoanticorpilor cardiospecifici și a markerilor epigenetici caracteristici pentru inducerea imunității antrenate.

Prin rezultatele obținute, proiectul IMMUNOCARD va contribui la dezvoltarea unei terapii imunomodulatoare eficiente împotriva leziunilor miocardice inflamatorii, reducând riscul de insuficiență cardiacă și va oferi o bază științifică pentru identificarea pacienților cu risc ridicat care necesită tratamente imunomodulatoare.

Detalii suplimentare se pot obține de la:

Persoană de contact: Dr. Adrian Manea

Funcție: Cercetător Principal, Coordonator științific local

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

Tel.: 021.319.45.18, Fax: 021.319.45.19, e-mail: adrian.manea@icbp.ro

”Conținutul acestui material nu reprezintă în mod obligatoriu poziția oficială a Uniunii Europene sau a Guvernului României”

Characterization of senescent versus early passages human amniotic fluid stem cells

F. Iordache[1], D. Alexandru[1], A. Georgescu[1], R. Airini[2], B. Amuzescu[2], L. Savu[3], H. Maniu[1]

[1]Institute of Cellular Biology and Pathology N. Simionescu of Romanian Academy, Bucharest, Romania
[2]University of Bucharest, Faculty of Biology, Bucharest, Romania
[3]S.C Genetic Lab S.R.L., Bucharest, Romania

Central and Eastern European Proteomic Conference CEEPC
24-26 October 2018
Bucharest, Romania

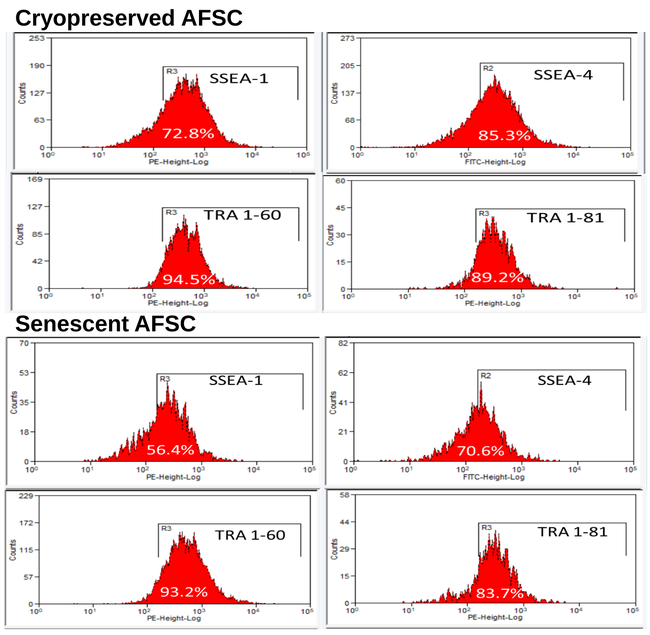
Introduction

Senescence represents an adaptive cellular response to potential stress. Although to date there is no unique marker to distinguish senescent cells from non-proliferating ones, a combination of markers can lead us to a senescent phenotype called senescence-associated secretory phenotype (SASP), consisting in a number of metabolic changes that try to remove stress factors. The present study aims to explore activation of specific signaling molecules associated with SASP in our in vitro senescence model.

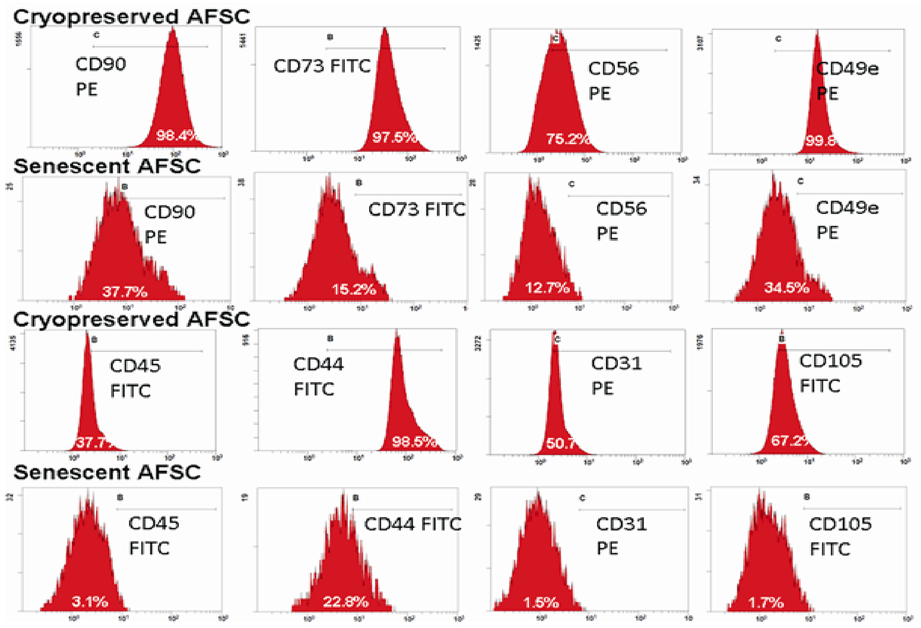
Materials and methods

Human amniotic fluid stem cells (AFSC) at passages 2 or 3 and senescent cells (maintained 40 days in culture without any passage) were analyzed for modification of stem cell markers by flow cytometry, for inflammatory markers by qRT-PCR and for ion currents by patch-clamp.

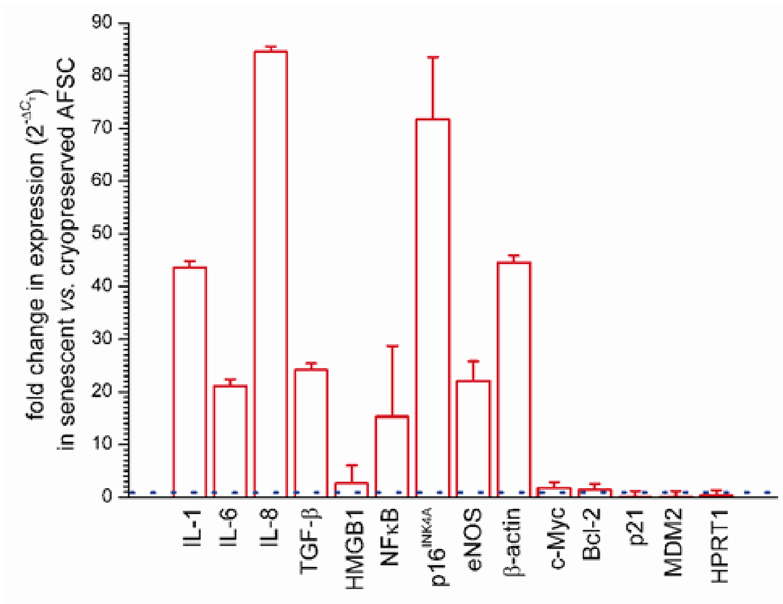
Results and Discussions



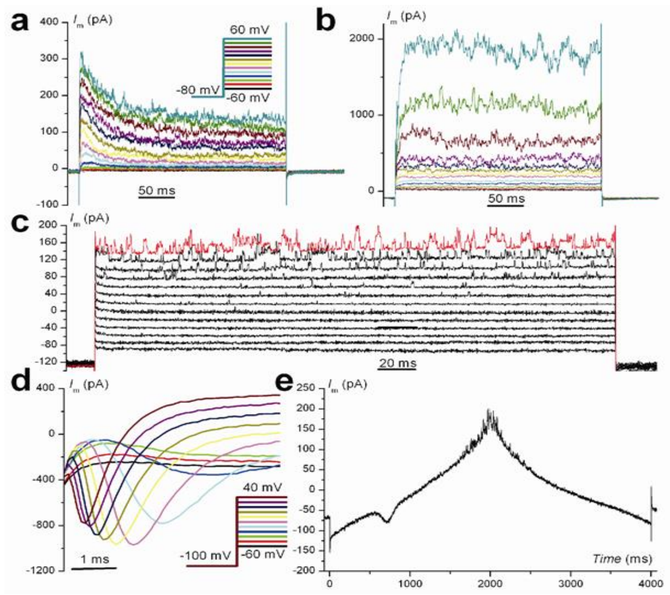
Flow cytometry assays for pluripotency stem cell markers SSEA-1, SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81 in cryopreserved and senescent AFSC. Percentages of positive cells for each marker indicated that the senescent cells did not loose pluripotency.



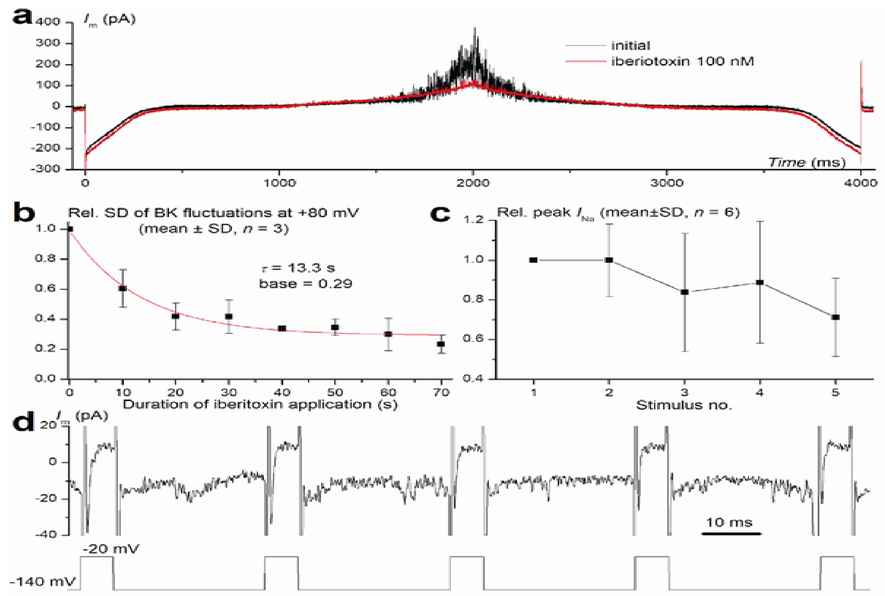
Flow cytometry assays for mesenchymal stem cell markers CD31, CD44, CD45, CD49e, CD56, CD73, CD90, CD105 in cryopreserved and senescent AFSC. Percentages of positive cells for each marker are indicated on the corresponding distribution histograms.



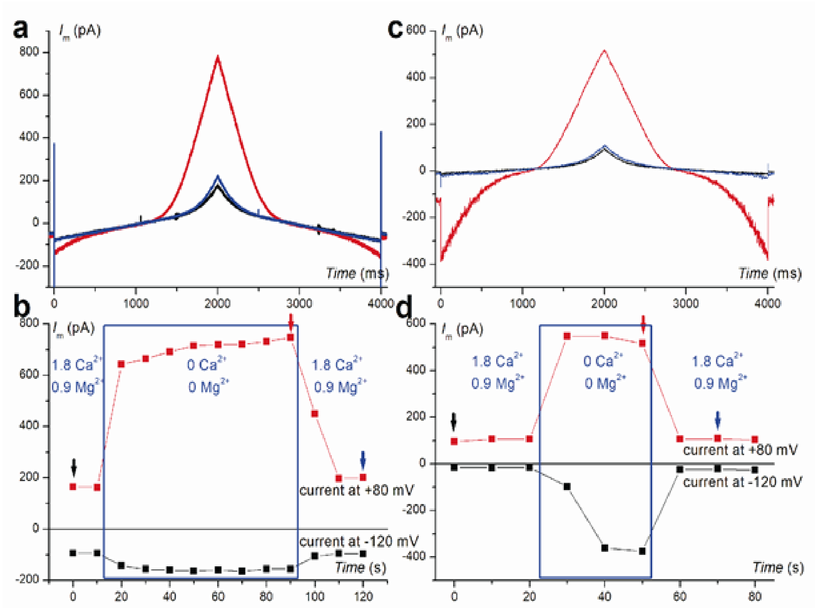
Differences in gene expression levels between senescent and early passages (cryopreserved) AFSC. The fold-change in expression in senescent vs. cryopreserved AFSC was computed as $2^{-\Delta Ct}$.



Ion currents recorded in AFSC. a and b. Two voltage-clamp recordings in senescent AFSC via automated patch-clamp, using a general protocol for K+ currents. I_{or} and BK fluctuations are visible in both recordings, while I_A can be noticed only in a; c. Same protocol applied to a cryopreserved AFSC with very small current levels; single-channel BK openings can be noticed at larger depolarizations (+20 to +60 mV); d. Voltage-dependent Na+ current (I_{Na}) in a senescent AFSC e. Double ramp voltage-clamp protocol applied to a senescent AFSC; a small T-type Ca^{2+} channel-like current with a threshold of ~-50 mV is present on the ascending ramp.



Pharmacology assays in cryopreserved AFSC via automated patch-clamp. a. Double-ramp voltage-clamp protocol with traces recorded before and during application of iberiotoxin 100 nM that blocked BK current fluctuations at positive potentials; b. Kinetics of BK channels block by iberiotoxin: Fitting with a mono-exponential function yielded a time constant τ =13.3s and a base of 0.29; c. Kinetics of use-dependent I_{Na} block by lidocaine 200 µM (relative peak I_{Na} amplitudes for 5 consecutive depolarizing pulses, mean±SD of n=3 experiments); d. Voltage-clamp protocol for study of use-dependent I_{Na} block by lidocaine (only the first 5 of 40 consecutive pulses are shown).



TRPM7-like currents in AFSC. a. and c. Current traces recorded with the double-ramp voltage protocol in a cryopreserved AFSC (a.) and a senescent AFSC (c.) before, during, and after divalent cation removal from external solutions (timing is marked with arrows of appropriate color in b. and d., respectively), revealing a large reversible monovalent cation current with a peculiar I-V plot compatible with TRPM7; b. and d. Time course of current amplitudes at -120 mV and +80 mV during external cation removal in the experiments shown in a. and c.

Conclusion. In our model we evidenced specific changes in senescent vs. early passages AFSC, suggesting a shift from an anti-inflammatory phenotype to a proinflammatory one, thus limiting their therapeutic potential.

Acknowledgments. The work was supported by project nr. 19/2018, PN-III-P1-1.1-PD-2016-1660 financed by the he Executive Agency for Higher Education, Research, Development and Innovation Funding (UEFISCDI).

ROMANIAN ACADEMY

INSTITUTE OF CELLULAR BIOLOGY AND PATHOLOGY

„NICOLAE SIMIONESCU”

MOLECULAR INTERVENTIONS ON THE EXPRESSION OF PRO AND ANTI-ATHEROGEN PROTEINS FOR DIMINISHING ATHEROSCLEROSIS

Scientific supervisor

Acad. Dr. Maya Simionescu

PhD student

Ioana Mădălina Fenyo

BUCHAREST

2013

TABLE OF CONTENTS

Forward 3

Abbreviations 4

INTRODUCTION 6

I. PART I – The current state of knowledge 8

I.1. Chapter I – NADPH oxidases – promoters of oxidative stress in atherosclerosis 9

I.1.1. Modifications induced by oxidative stress in atherosclerosis 9

I.1.2. Sources of reactive oxygen species in the vascular system 11

I.1.3. Structural and functional characterization of vascular NADPH oxidases 14

I.1.4. Distribution of NADPH oxidases in the vascular wall 19

I.1.5. Regulation of vascular NADPH oxidases activity and expression 23

I.1.6. Methods of inhibiting NADPH oxidases activity in order to reduce the oxidative stress 27

I.2. Chapter II – Apolipoprotein E – role and involvement in atherosclerosis 33

I.2.1. Structural and functional characterization of apolipoprotein E 34

I.2.2. Role of apoE in lipid metabolism 41

I.2.3. Role of apoE in atherosclerosis 43

I.2.4. Murine experimental models for the study of apoE 48

II. PART II – Original contributions 55

Hypothesis and objectives 56

II.1. Objective I – Reducing the oxidative stress in atherosclerosis by inhibiting NADPH oxidase activity 58

II.1.1. Introduction 58

II.1.2. Materials and methods 59

II.1.3. Results and discussions 69

II.1.3.1. Evaluation of oxidative stress and inflammation in the vascular wall of hypercholesterolemic mice 69

II.1.3.2. The effect of tyrphostin AG490 treatment on the expression and activity of NAPDH oxidase in the aortas of hypercholesterolemic

ApoE$^{-/-}$ mice 76
II.1.3.3. The effect of WP1066 treatment on the expression and activity of NAPDH oxidase in the aortas of hypercholesterolemic ApoE$^{-/-}$ mice 86
II.1.4. Conclusions and perspectives 90
II.2. Objective 2 – Developing strategies to increase the expression of apolipoprotein E in cells involved in the atherosclerotic plaque 93
II.2.1. The study of retinoid induced modulation of apolipoprotein E gene expression in macrophages 94
II.2.1.1. Introduction 94
II.2.1.2. Materials and methods 95
II.2.1.3. Results and discussions 101
II.2.1.4. Conclusions and perspectives 105
II.2.2. Generation of a murine conditional transgenic model to induce in a controlled manner the expression of human apolipoprotein E isoform E3 specifically in the vascular endothelium 106
II.2.2.1. Introduction 106
II.2.2.2. Materials and methods 110
II.2.2.3. Results and discussions 137
II.2.2.4. Conclusions and perspectives 160
C. GENERAL CONCLUSIONS 161
D. REFERENCES 164
E. LIST OF PUBLISHED PAPERS 176

KEYWORDS: cardiovascular disease, atherosclerosis, oxidative stress, NADPH oxidase, AG490, WP1066, apoE deficient mice, apolipoprotein E, macrophages, retinoids, transgenesis, alternative therapies

ABSTRACT

Atherosclerosis is a complex disease characterized by the accumulation of lipid deposits in the arterial wall, which in time turn into advanced plaques, with complex cellular and molecular architecture and the composition, that disrupt the normal flow of blood and that, following erosion or rupture, may lead to acute coronary syndromes such as myocardial infarction and stroke.

Over time, many theories have been proposed to explain the formation of atherosclerotic plaques. Today, the causal relationship between hypercholesterolemia, development of atherosclerotic lesions and cardiovascular diseases is universally proven and accepted. However, the so-called "cholesterol hypothesis" can not exclusively illustrate the complexity of the pathologic process in atherosclerosis, which comprises, among others, the activation and the dysfunction of endothelial cells (EC), as well as the inflammatory process which takes a major role in all lesional phases ("response to injury hypothesis"), the retention of atherogenic lipoproteins in the subendothelial space ("response to retention hypothesis") and their oxidative modifications ("oxidative modifications hypothesis").

Moreover, the multitude of scientific data accumulated so far shows that atherosclerosis is a multifactorial disease in which participates a number of other risk factors such as hypertension, hyperglycemia and diabetes mellitus, obesity, smoking and family history.

The approaches currently in use for the treatment of atherosclerosis are focused mainly on regulating cholesterol metabolism and lipoprotein metabolism, on reducing the inflammatory process or on preventing the thrombotic complications. Nevertheless, these therapies do not work in all patients. Therefore, in order to increase the efficiency of the treatment it is necessary to find alternative therapeutic methods.

The different therapeutic strategies used so far to counteract oxidative stress have focused mainly on the use of antioxidant supplements and vitamins or finding selective inhibitors of various enzymatic sources of reactive oxygen species (ROS). Although promising in the beginning, the antioxidant therapy has not produced the expected results in several randomized clinical trials because these compounds act only

as ROS scavengers and not as modulators of the different intracellular redox signaling processes that occur in the vascular wall.

Because of their major contribution to the generation of ROS and their involvement in mediating signals induced by various cardiovascular risk factors, the pharmacological inhibition of vascular NADPH oxidases (Nox) is considered an attractive and potentially effective strategy to combat oxidative stress associated with various pathological conditions.

As an alternative to the direct inhibition of Nox, one can take into account other efficient options, such as the pleiotropic effect of some conventional drugs used to treat cardiovascular disorders (for example, statins, inhibitors of angiotensin converting enzyme, angiotensin II receptor blockers, thiazolidinediones), or *the targeting of different specific signaling pathways involved in regulating the expression and activity of NADPH oxidases*.

Therefore, the first objective of this thesis is "*Reducing oxidative stress in atherosclerosis by inhibiting NADPH oxidase activity*".

On the other hand, another process deeply affected in atherosclerosis is the efflux of lipoprotein particles from the subendothelial space and from the foam cells accumulated in the atherosclerotic lesions. A possible approach in order to improve this issue is *to increase the expression of different proteins involved in the process and which have a beneficial action in atherosclerosis, such as apolipoprotein E*.

Therefore, the second objective of this thesis is "*Developing strategies to increase the expression of apolipoprotein E in cells involved in the atherosclerotic plaque*".

The present paper is structured into two main parts and a chapter of general conclusions.

Part I - The current state of knowledge, is a review of the literature concerning the two proteins studied and their involvement in atherosclerosis. Part I consists of two chapters.

Chapter 1 – NADPH oxidases - promoters of oxidative stress in atherosclerosis, presents published data relating to: the modifications induced by oxidative stress in atherosclerosis; the sources of ROS in the vascular system; the structural and functional characterization of vascular NADPH oxidases; the distribution of NADPH oxidases in the

vascular wall; the regulation of vascular NADPH oxidases activity and expression, and methods of inhibiting NADPH oxidases activity in order to reduce the oxidative stress.

Chapter 2 – Apolipoprotein E – role and involvement in atherosclerosis, presents published data relating to: the structural and functional characterization of apolipoprotein E gene and protein, apoE isoforms and apoE receptors; the role of apoE in lipid metabolism; the role of apoE in atherosclerosis; features of apoE expression and secretion characteristic to macrophages, and murine experimental models for the study of apoE.

PART II - Original contributions, summarizes the experimental data gathered to achieve two main objectives.

Objective I - Reducing oxidative stress in atherosclerosis by inhibiting NADPH oxidase activity, aimed to investigate the potential of two pharmacological inhibitors of Jak2 signaling pathway, compounds AG490 and WP1066, have to diminish the NADPH oxidases dependent ROS generation and to reduce the development of atherosclerotic lesions in hypercholesterolemic ApoE-deficient mice (apoE$^{-/-}$).

1. Evaluation of oxidative stress and inflammation in the vascular wall of hypercholesterolemic mice. The experiments have shown that hypercholesterolemia is associated with increased oxidative stress and inflammation in the aortas of hypercholesterolemic mice. This is demonstrated by a significant increase in gene and protein expression levels of all Nox isoforms, a feature characterizing both early and more advanced stages of atherosclerosis. This growth translates into a sustained production of ROS in the vascular wall.

2. The effect of tyrphostin AG490 treatment on the expression and activity of NAPDH oxidase in the aortas of hypercholesterolemic ApoE$^{-/-}$ mice. The experiments have shown that treatment of ApoE$^{-/-}$ mice fed a high cholesterol diet with tyrphostin AG490 has reduced significantly Nox activity and decreased the mRNA and protein expression levels of each Nox isoform. In addition, the administration of AG490 in hypercholesterolemic ApoE$^{-/-}$ mice induced a significant reduction of macrophage infiltration in the aortic wall as compared to vehicle-injected animals. Consistent with this observation, the morphometric analysis of the lesions showed a significant reduction of early lesions in total aortas and aortic arches in animals treated with AG490 compared to the ApoE$^{-/-}$ mice fed a high cholesterol diet.

3. The effect of WP1066 treatment on the expression and activity of NAPDH oxidase in the aortas of hypercholesterolemic ApoE-/- mice. The results showed that the treatment with WP1066 significantly reduces NOX activity and the mRNA expression levels of Nox1 and Nox4 isoforms. Moreover, the pharmacological inhibition of Jak2 by WP1066 slightly reduced atherosclerotic lesion area expansion, but not in a significant way.

The results obtained in the experiments made under Objective 1 represent the first study to demonstrate that AG490 has an anti-atherosclerotic and anti-oxidant effect *in vivo* by regulating Nox, highlighting a new mechanism of tyrphostin action in the cardiovascular system. Taken together, these results suggest that the modulation of signaling pathways activated by Jak may represent a new pharmacological strategy to counteract the harmful effects of oxidative stress in atherosclerosis.

Objective 2 - Developing strategies to increase the expression of apolipoprotein E in cells involved in the atherosclerotic plaque, was to find ways to increase or induce the expression of apoE in the arterial wall. For this, the experiments have focused on two cell types involved in the development and progression of atherosclerotic lesions, namely macrophages and EC.

1. The study of retinoid induced modulation of apolipoprotein E gene expression in macrophages. The selective expression of apoE in macrophages has potential for the reduction of the cardiovascular risk. Targeting processes such as the apoE expression and secretion in macrophages allows, on one hand, to investigate the role played by the apoE secreted by these cells in the economy of the plaque, and on the other hand, may represent a therapeutic strategy in atherosclerosis . This study aimed to find out whether there is a direct effect of retinoids on apoE gene expression in macrophages and to investigate the mechanism involved. The results demonstrate that retinoids induce the increase of endogenous apoE gene expression in macrophages, both *in vitro* and *in vivo*. Thus, 9-cis retinoic acid induced the increase of apoE mRNA level in RAW 264.7 murine macrophages and vitamin A increases the apoE gene expression in mouse peritoneal macrophages. 9-cis retinoic acid does not act directly on the gene promoter but it exerts its effect on the multienhancer ME.2, by means of which it induces a significant increase in the promoter activity, an increase demonstrated in transfection experiments by the increase in luciferase activity . The analysis of a series of deletion

mutants of ME.2 indicated the existence of a binding site for RXR in the region 405-420 of ME.2. The increase in apoE expression in macrophages is a new potential beneficial effect of retinoids, suggesting that these compounds may have therapeutic use for the regulation of lipid metabolism and in the prevention and/or amelioration of atherosclerosis.

2. Generation of a murine conditional transgenic model to induce in a controlled manner the expression of human apolipoprotein E isoform E3 specifically in the vascular endothelium. EC do not expresse apoE but they express receptors from the LDLR family that recognize and bind apoE. Moreover, they are capable to do transcytosis, transporting macromolecules between blood and the subendothelial space. In view of these functional characteristics of EC, the induction of apoE gene expression in the endothelium may contribute, on one hand, to the rise of plasmatic levels of apoE, increasing its beneficial effects at systemic level, and on the other hand, to the increase of apoE concentration in the plaque, where it could actively participate in the efflux of lipoproteins from the subendothelial space.

The mechanistic principle at the base of the generation of this model was the principle transcriptional transactivation dependent of tetracycline. In the experiments reported in the present paper, we used the binary gene expression system Tet-On 3G (Clontech) to produce two transgenes:

(i) the transgene Tek/Tie2promoter-Tet3G-Tek/Tie2enhancer (referred to as Tek Tet3G) (5200pb) containing the transactivator protein Tet-On3G gene under control of the endothelial specific promoter Tek/Tie2 which ensures the expression specific to the endothelium. The transgene also contains the specific endothelial enhancer Tek/Tie2 that regulates the promoter activity ensuring sustained expression.

(ii) the transgene TRE-hapoE3 (5523pb) containing the gene of interest for human ApoE3 isoform under the control of the P_{TRE3G} inducible promoter.

In the presence of inducer doxycycline (Dox), a synthetic derivative of tetracycline, Tet-On 3G specifically binds to P_{TRE3G} and activates the transcription of the gene of interest. P_{TRE3G} does not contain any binding sites for endogenous mammalian transcription factors, so it is essentially inactive in the absence of the inducer Dox.

Each of the two transgenes was used to create a transgenic animal: a mouse that carries the Tek-Tet3G transgene, and a mouse that carries the TRE-hapoE3transgene.

By pairing these two animals, a double transgenic mouse will be produced, carrying both transgenes, and which will express the human ApoE3 isoform only when Dox should be administered.

To ensure the human ApoE3 isoform expression in the absence of endogenous murine apoE gene, this double transgenic mouse will be mated with mice ApoE$^{-/-}$ mice, deficient in apoE.

In this paper, we present the first three stages undertaken to generate this model, namely:

A. The construction of the transgenes – in order to obtain the constructs for transgenesis, we have used classical molecular cloning techniques (bacterial transformation, restriction digestion, dephosphorylation, and ligation). In the present study, the transgenes required to generate a conditional transgenic murine model in which the expression of the human ApoE3 isoform can be induced in a controlled manner, in the absence of endogenous murine apoE gene, were successfully obtained. The functionality of the constructs has been demonstrated by the results obtained after transfecting several cell types with plasmids containing the transgenes, followed by cultivation of the cells in medium supplemented with or without Dox. The functionality and the specificity of the endothelial Tek/Tie2 promoter has also been demonstrated by measuring its ability to activate the transcription of the luciferase gene specifically in the endothelial cells.

B. The transgenesis procedure – the transfer of transgenes into the animals. The method used in this study to generate transgenic animals was the classical method of transgenesis, namely the pronuclear DNA microinjection.

For the transgenesis procedure, we used four types of animals: fertilized eggs donor females; fertile males used to obtain fertilized eggs; pseudo-pregnant females used as surrogate mothers, and vasectomised males used to obtain pseudo-pregnant females. The transgenesis procedure involved: the collection of embryos after prior induction of superovulation by the use of placental hormones in fertilized eggs donor FVB females; the transfer of DNA (the two transgene linearized and purified) made by microinjection into the male pronucleus of a fertilized egg. The volume of DNA solution injected per egg was of the order of picolitres, and the concentration of DNA used varied

from 1 to 5ng/µl; the re-implantation of viable eggs into pseud-pregnant B6CBAF1 females. B6CBA males were used to generate vasectomized males.

In the present thesis, three rounds of transgenesis were performed - two for the transgene TRE-hapoE3 and one for transgene Tek-Teton.

C. Identification of the founders – the PCR genotyping of the offspring resulted in the first generation and the identification of animals positive for the transgenes. Following the transgenesis experiments, we managed to obtain one founder to be used for starting a line of transgenic mice carrying the TRE-hapoE3 transgene, line that is to be further used to obtain a double transgenic mouse in which the expression of the human ApoE3 can be induced by Dox administration.

GENERAL CONCLUSIONS. This thesis addresses an actual topic in the field of biomedical sciences, namely finding new alternative methods for preventing and slowing down the atherosclerotic process.

This paper proposes a new strategy to target the NADPH oxidase activity in order to improve the vascular production of ROS under conditions of hypercholesterolemia. The results demonstrated that such an approach, in this case targeting signaling pathways that control the function of NADPH oxidases, provides a valid perspective for therapy. Specifically, the modulation of the signaling pathways activated by Jak may represent a new pharmacological strategy to counteract the harmful effects of oxidative stress in atherosclerosis.

The paper also proposes two strategies with respect to the way by which the efflux of lipoprotein particles accumulated in foam cells and in the subendothelial space may be modulated by increasing the expression of apoE, a protein with well-known anti-atherogenic functions. The first strategy identifies vitamin A and retinoids as modulators of apolipoprotein E gene expression in macrophages, and demonstrates that these compounds may induce an increased expression of endogenous apoE gene in macrophages both *in vitro* and *in vivo*. The results suggest that these compounds may have a therapeutic use for the regulation of lipid metabolism and in the prevention and/or the amelioration of atherosclerosis.

The second strategy refers to the induction of apoE gene expression in endothelial cells, and proposes to generate a conditional transgenic murine model in which the expression of the human apoE3 isoform can be induced in a controlled

manner, in the absence of endogenous murine apoE gene. In the present study, the first three stages of the development of such a model were achieved, first by obtaining and successfully testing the necessary transgenes. The transgenesis experiments generated one founder that will further be used to set up a strain of mice transgenic for TRE - hapoE3 to be used to obtain the double transgenic mice in which the expression of human apoE3 can be induced by Dox administration. The creation of this model will enable further investigation regarding the apoE function in atherosclerosis and how an increased concentration of this protein in the plaque, as well as in the circulation, can improve the pathological process.

ACADEMIE ROUMAINE

INSTITUT DE BIOLOGIE ET PATHOLOGIE CELLULAIRE

„NICOLAE SIMIONESCU”

INTERVENTIONS MOLECULAIRES SUR L’EXPRESSION DES PROTEINES PRO ET ANTIATHEROGENES POUR L’AMELIORATION DE L’ATHEROSCLEROSE

Coordonnateur scientifique

Acad. Dr. Maya Simionescu

Doctorant

Ioana Mădălina Fenyo

BUCAREST

2013

SOMAIRE

Avant lettre 3

Abréviations 4

INTRODUCTION 6

I. PARTIE I – L'état actuel des connaissances 8

I.1. Chapitre 1 - Les NADPH oxydases – promoteurs de stress oxydatif dans l'athérosclérose 9

I.1.1. Les changements induites par le stress oxydatif dans l'athérosclérose 9

I.1.2. Les sources générateurs des ERO au niveau vasculaires 11

I.1.3. La caractérisation structurale et fonctionnelle des NADPH oxydases vasculaires 14

I.1.4. La distribution des NADPH oxydases dans la paroi vasculaire 19

I.1.5. La régulation de l'expression et de l'activité des NADPH oxydases au niveau vasculaire 23

I.1.6. Méthodes d'inhibition de l'activité des NADPH oxydases pour réduire le stress oxydatif 27

I.2. Chapitre 2 - L'apolipoprotéine E – rôle et implications dans l'athérosclérose 33

I.2.1. La caractérisation structurale et fonctionnelle d'apoE 34

I.2.2. Le rôle d'apoE dans le métabolisme des lipoprotéines 41

I.2.3. Le rôle d'apoE dans l'athérosclérose 43

I.2.4. Modèles expérimentaux murins pour l'étude d'apoE 48

II. PARTIE II – Contributions originales 55

Hypothèses et objectives 56

II.1. Objectif I – Réduire le stress oxydatif dans l'athérosclérose en inhibant l'activité de la NADPH oxydase 58

II.1.1. Introduction 58

II.1.2. Matériaux et méthodes 59

II.1.3. Résultats et discussions 69

II.1.3.1. L'évaluation du stress oxydatif et de l'inflammation dans la paroi vasculaire des souris hypercholestérolémiques 69

II.1.3.2. L'effet de l'administration de la tyrphostine AG490 sur l'expression et l'activité de la NADPH oxydase dans l'aorte des souris ApoE-/- hypercholestérolémiques 76
II.1.3.3. L'effet du WP1066 sur l'expression et l'activité de la NADPH oxydase dans l'aorte des souris ApoE-/- hypercholestérolémiques 86
II.1.4. Conclusions et perspectives 90
II.2. Objectif 2 – Élaborer des stratégies pour augmenter l'expression de l'apolipoprotéine E dans des cellules impliquées dans la plaque 93
II.2.1. L'Étude de la modulation par les rétinoïdes de l'expression du gène d'apolipoprotéine E dans les macrophages 94
II.2.1.1. Introduction 94
II.2.1.2. Matériaux et méthodes 95
II.2.1.3. Résultats et discussions 101
II.2.1.4. Conclusions et perspectives 105
II.2.2. Génération d'un modèle murin transgénique de type conditionnel, dans lequel on puisse induire d'une manière contrôlé l'expression de l'isoforme E3 d'apoE humaine, spécifiquement dans l'endothélium vasculaire 106
II.2.2.1. Introduction 106
II.2.2.2. Matériaux et méthodes 110
II.2.2.3. Résultats et discussions 137
II.2.2.4. Conclusions et perspectives 160
C. CONCLUSIONS GENERALES 161
D. BIBLIOGRAPHIE 164
E. LISTE DES ARTICLES SCIENTIFIQUES PUBLIES 176

MOTS CLÉS : maladies cardio-vasculaires, athérosclérose, stress oxydatif, NADPH oxydases, AG490, WP1066, souris déficientes en ApoE, apolipoprotéine E, macrophages, rétinoïdes, transgénèse, thérapies alternatives

RESUME

L'athérosclérose est une maladie complexe, caractérisé par l'accumulation des dépôts de lipides dans la paroi artérielle, qui évoluent pour former des plaques avancées, avec une architecture et composition cellulaire et moléculaire complexes, qui interrompent l'écoulement normal du sang et peuvent conduire, suite à l'érosion ou à la rupture, à des syndromes coronariens aigus tels que l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral.

Avec le temps, des nombreuses théories ont été proposées pour expliquer la formation de plaques d'athérosclérose. Aujourd'hui, le lien de causalité entre l'hypercholestérolémie, le développement des lésions athérosclérotiques et les maladies cardiovasculaires, est universellement éprouvé et accepté. Cependant, la soi-disant «l'hypothèse de cholestérol» ne peut pas strictement illustrer la complexité de la pathologie de l'athérosclérose, qui comprend, entre autres, l'activation et le dysfonctionnement des cellules endothéliales (CE), aussi que l'inflammation qui joue un rôle dans toutes les étapes de la lésion (« l'hypothèse de la réponse à la lésion »), la rétention de lipoprotéines athérogènes dans l'espace sous-endothélial (« l'hypothèse de la réponse à la rétention») et leurs modifications oxydatives («hypothèse des modification oxydative»).

De plus, la multitude de données scientifiques accumulées à ce jour montre que l'athérosclérose est une maladie multifactorielle et qu'à son développement contribue aussi un certain nombre d'autres facteurs de risque tels que l'hypertension, l'hyperglycémie et le diabète sucré, l'obésité, le tabagisme et les antécédents familiaux.

Les approches utilisées actuellement dans le traitement de l'athérosclérose sont principalement dirigées vers la régulation du métabolisme du cholestérol et du métabolisme des lipoprotéines, la réduction de l'inflammation ou la prévention des complications thrombotiques. Cependant, ces thérapies ne fonctionnent pas chez tous les patients. Par conséquent, afin d'augmenter l'efficacité du traitement il est nécessaire de trouver des méthodes thérapeutiques alternatives.

Les différentes stratégies thérapeutiques utilisées jusqu'à présent pour lutter contre le stress oxydatif se sont appuies principalement sur l'utilisation des

antioxydants sous forme des suppléments et des vitamines, ou ont essayé de trouver des inhibiteurs sélectifs de différentes sources enzymatiques d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Bien que prometteur au début, le traitement antioxydant n'a pas produit les résultats escomptés dans plusieurs essais cliniques randomisés, parce que ces composés agissent seulement comme pièges pour ERO et pas comme médiateurs des réactions de signalisation redox intracellulaires qui ont lieux dans la paroi vasculaire.

En raison de leur contribution importante à la génération des ERO et de leur implication dans la médiation de signaux induits par divers facteurs de risque cardio-vasculaires, l'inhibition pharmacologique des enzymes NADPH oxydases (Nox) vasculaires est considéré comme une stratégie potentiellement attrayante et efficace pour lutter contre le stress oxydatif associé à divers conditions pathologiques.

Comme alternative à l'inhibition directe des NADPH oxydases, on peut considérer comme options efficaces les effets pléiotropes des médicaments classiques utilisés dans les maladies cardio-vasculaires (par exemple, les statines, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II, les thiazolidinediones) ou cibler des voies de signalisation spécifiques impliqués dans la régulation de l'expression et de l'activité des NADPH oxydases.

Par conséquent, le premier objectif de cette thèse est *«Réduire le stress oxydatif dans l'athérosclérose en inhibant l'activité de la NADPH oxydase ».*

D'autre part, un processus profondément perturbé en athérosclérose est l'efflux des particules de lipoprotéines de l'espace sous-endothéliale et des cellules spumeuses formées dans les lésions athérosclérotiques. Une approche possible pour améliorer ce problème est *d'augmenter l'expression des certaines protéines impliquées dans le processus et qui ont une action bénéfique en athérosclérose, telle que l'apolipoprotéine E.*

Par conséquent, le deuxième objectif de cette thèse est «Élaborer des stratégies pour augmenter l'expression de l'apolipoprotéine E dans des cellules impliquées dans la plaque ».

La thèse est structurée en deux parties principales et un chapitre de conclusions générales.

PARTIE I - L'état actuel des connaissances, est un examen des données de la littérature sur les deux protéines étudiées et leur implication dans l'athérosclérose. La première partie comporte deux chapitres.

Chapitre 1 - Les NADPH oxydases – promoteurs de stress oxydatif dans l'athérosclérose, présente des données de la littérature sur: les changements induites par le stress oxydatif dans l'athérosclérose ; les sources générateurs des ERO au niveau vasculaires ; la caractérisation structurale et fonctionnelle des NADPH oxydases vasculaires ; la distribution des NADPH oxydases dans la paroi vasculaire ; la régulation de l'expression et de l'activité des NADPH oxydases au niveau vasculaire, et des méthodes d'inhibition de l'activité des NADPH oxydases pour réduire le stress oxydatif.

Chapitre 2 - L'apolipoprotéine E –rôle et implications dans l'athérosclérose, présente des données de la littérature concernant : la caractérisation structurale et fonctionnelle du gène et de la protéine apoE, les isoformes d'apoE, les récepteurs pour apoE ; le rôle d'apoE dans le métabolisme des lipoprotéines ; le rôle d'apoE dans l'athérosclérose; les caractéristiques de l'expression et de la sécrétion d'apoE par les macrophages, et des modèles expérimentaux murins pour l'étude d'apoE.

PARTIE II - Les contributions originales, réunisse les données expérimentales qui répondent à deux objectifs principaux.

Objectif I - Réduire le stress oxydatif dans l'athérosclérose en inhibant l'activité de la NADPH oxydase, visait à étudier le potentiel que deux inhibiteurs pharmacologiques de la voie de signalisation Jak2, AG490 et WP1066, l'ont de réduire les ERO générées par les NADPH oxydases et de réduire le développement des lésions athérosclérotiques dans souris déficientes en ApoE (ApoE$^{-/-}$) hypercholestérolémiques.

1. L'évaluation du stress oxydatif et de l'inflammation dans la paroi vasculaire des souris hypercholestérolémiques. Les expériences ont montré que l'hypercholestérolémie est associée à une augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation dans les aortes des souris hypercholestérolémiques. Cela est démontré par une augmentation significative des niveaux d'expression génique et protéique de toutes les isoformes Nox, trait qui caractérise les premières étapes aussi que les stades plus avancés de l'athérosclérose. Cette augmentation e traduit par une production soutenue d'ERO dans la paroi vasculaire.

2. L'effet de l'administration de tyrphostine AG490 sur l'expression et l'activité de la NADPH oxydase dans l'aorte des souris ApoE$^{-/-}$ hypercholestérolémiques. Les expériences ont montré que le traitement avec AG490 des souris ApoE$^{-/-}$ nourris avec une diète riche en cholestérol a réduit considérablement l'activité des Nox et a déterminé la diminution des niveaux d'expression de l'ARNm et de protéines pour chaque isoforme Nox. Aussi, l'administration de AG490 à des souris ApoE$^{-/-}$ hypercholestérolémiques a induit une réduction significative de l'infiltration des macrophages dans la paroi de l'aorte par rapport à des animaux injectés avec le véhicule. En accord avec cette observation, l'analyse morphométrique des lésions a montré une réduction significative des lésions naissantes dans les aortes entières et dans l'arche aortique des animaux traitées avec AG490 par rapport aux souris ApoE$^{-/-}$ nourris avec un régime riche en cholestérol.

3. L'effet du WP1066 sur l'expression et l'activité de la NADPH oxydase dans l'aorte des souris ApoE$^{-/-}$ hypercholestérolémiques. Les résultats ont montré que le traitement avec WP1066 réduit de manière significative l'activité des NOX et les niveaux d'expression d'ARNm des isoformes Nox1 et Nox4. De plus, l'inhibition pharmacologique de Jak2 par WP1066 a réduit légèrement la zone d'expansion des lésions athérosclérotiques, mais pas de façon significative.

Les résultats obtenus dans les expériences réalisées pour l'Objectif 1 représentent la première étude à démontrer qu'AG490 a des propriétés anti-athérosclérotiques et anti-oxydantes *in vivo* par le contrôle des enzymes Nox, mettant en évidence un nouveau mécanisme d'action des tyrphostines au niveau du système cardio-vasculaire. Ensemble, ces résultats suggèrent que la modulation des voies de signalisation activées par Jak peut représenter une nouvelle stratégie pharmacologique pour contrer les effets néfastes du stress oxydatif dans l'athérosclérose.

Objectif 2 - Élaborer des stratégies pour augmenter l'expression de l'apolipoprotéine E dans des cellules impliquées dans la plaque, était de trouver des moyens pour augmenter ou pour induire l'expression d'apoE dans la paroi artérielle. Pour cela, des expériences ont été portées sur deux types cellulaires impliqués dans le développement et la progression des lésions athérosclérotiques, à savoir les macrophages et les CE.

1. L'Étude de la modulation par les rétinoïdes de l'expression du gène d'apolipoprotéine E dans les macrophages. L'expression sélective d'apoE dans les macrophages a le potentiel de réduire le risque cardio-vasculaire. Le ciblage de l'expression et de la sécrétion d'apoE dans les macrophages, permet d'une part, d'étudier le rôle de l'apoE sécrétée par ces cellules dans l'économie de la plaque, et d'autre part peut être une stratégie thérapeutique dans l'athérosclérose. Cette étude visait à déterminer s'il existe un effet direct des rétinoïdes sur l'expression du gène apoE dans les macrophages et d'étudier le mécanisme impliqué. Les résultats démontrent que les rétinoïdes induisent l'augmentation de l'expression endogène du gène apoE dans les macrophages, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, l'acide 9 -cis- rétinoïque acide induis la croissance du niveau de l'ARNm de l'apoE dans la lignée de macrophages murins RAW 264.7 et la vitamine A augmente l'expression du gène de l'apoE dans les macrophages péritonéaux de souris. L'acide 9 -cis- rétinoïque n'agit pas directement sur le promoteur du gène mais sur le multi-enhancer ME.2, en induisant une augmentation significative de l'activité du promoteur, augmentation mise en évidence par l'augmentation de l'activité de la luciférase dans des expériences de transfection. L'analyse d'une série de mutants de délétion de ME.2 indique l'existence d'un site reconnu par RXR dans la région 405-420 de ME.2. L'augmentation de l'expression d'apoE dans les macrophages est un nouveau effet bénéfique potentiel de rétinoïdes, ce qui suggère que ces composés peuvent avoir un usage thérapeutique pour la régulation du métabolisme lipidique et dans la prévention et / ou l'amélioration de l'athérosclérose.

2. Génération d'un modèle murin transgénique de type conditionnel, dans lequel on puisse induire d'une manière contrôlé l'expression de l'isoforme E3 d'apoE humaine, spécifiquement dans l'endothélium vasculaire. CE n'expriment pas apoE mais expriment des récepteurs de la famille LDLR qui reconnaissent et lient apoE. En outre, elles sont capables de faire de la transcytose, le transport des macromolécules entre le sang et l'espace sous-endothélial. Compte tenu de ces caractéristiques fonctionnelles des CE, l'induction de l'expression du gène d'apoE dans l'endothélium peut contribuer d'une part à l'augmentation des niveaux plasmatiques d'apoE, ce qui augmente ses effets bénéfiques sur le plan systémique, et d'autre part, à l'augmentation de la concentration

d'apoE dans la plaque, où elle pourrait participer activement à l'efflux des lipoprotéines de l'espace sous-endothélial.

Le principe qui a conduit à la génération de ce modèle est celui de la transactivation de la transcription dépendante de la tétracycline. Dans les expériences rapportées dans le présent document, nous avons utilisé le système l'expression binaire Tet-On 3G (Clontech) pour produire deux transgènes :

(i) le transgène Tek/Tie2promoter-Tet3G-Tek/Tie2enhancer (dénommé Tek Tet3G) (5200pb) contenant le gène de la protéine transactivatrice Tet-On3G sous le contrôle du promoteur spécifique endothélial Tek/Tie2 qui assure une expression spécifique dans l'endothélium. Le transgène contient aussi l'enhancer spécifique endothélial Tek/Tie2 qui régulent l'activité du promoteur assurant une expression soutenue.

(ii) le transgène TRE-hapoE3 (5523pb) contenant le gène d'intérêt ApoE3 humaine sous le contrôle du promoteur inductible P_{TRE3G}.

En présence de l'inducteur doxycycline (Dox), un dérivé synthétique de la tétracycline, Tet-On 3G se lie spécifiquement à P_{TRE3G} et active la transcription du gène d'intérêt. P_{TRE3G} ne contient pas de sites de liaison pour des facteurs de transcription endogènes des mammifères, de sorte qu'il est essentiellement inactif en l'absence d'inducteur Dox.

Chacun des deux transgènes a été utilisé pour créer un animal transgénique : une souris qui porte le transgène Tek-Tet3G, et une souris qui portent le transgène TRE-hapoE3. En croisant les deux animaux, on va obtenir une souris double transgénique qui aura les deux transgènes et qui exprimera l'isoforme ApoE3 humaine seulement lorsque le traitement avec Dox sera administré.

Pour obtenir l'expression de l'isoforme ApoE3 humaine en l'absence du gène apoE murine endogène, les souris double transgéniques seront accouplées avec des souris déficientes en ApoE (ApoE$^{-/-}$).

Dans cette thèse, sont présentées les trois premières étapes nécessaires pour l'obtention de ce modèle, à savoir :

A. Obtenir les transgènes – on a utilisé des techniques classiques de clonage moléculaire (transformation bactérienne, digestion avec des enzymes de restriction, déphosphorylation, ligation). Dans la présente étude, on a obtenu avec succès les

transgènes nécessaires pour générer le modèle murin transgénique de type conditionnel, dans lequel on puisse induire d'une manière contrôlé l'expression de l'isoforme E3 d'apoE humaine, en l'absence du gène apoE murine endogène. La fonctionnalité des cassettes de transgénèse a été montré par les résultats obtenus après la transfection de plusieurs types de cellules avec des plasmides contenant les transgènes, suivie par la culture des cellules dans du milieu supplémenté avec ou sans Dox. La fonctionnalité et de la spécificité du promoteur endothélial Tek/Tie2 a également été démontrée par la mesure de sa capacité d'activer la transcription du gène de la luciférase spécifiquement dans des cellules endothéliales.

B. La transgénèse - procédure à suivre pour le transfert de transgènes dans l'animal. La méthode utilisée dans cette étude pour obtenir des animaux transgéniques a été la méthode classique de transgénèse impliquant la micro-injection pronucléaire de l'ADN.

Pour la procédure de transgénèse nous avons utilisé quatre types d'animaux : des femelles donateurs d'œufs fécondés ; des mâles fertiles pour obtenir des œufs fécondés ; des femelles utilisées comme mères porteuses pseudo-gestantes ; des mâles vasectomisés utilisés pour obtenir les femelles pseudo-gestantes. La procédure de transgénèse a impliqué : la collection d'œufs fécondés après l'induction de la superovulation avec des hormones placentaires dans des femelles FVB donateurs ; le transfert de l'ADN (deux transgène linéarisés et purifiés) a été faite par micro-injection dans le pronucleus mâle d'un ovule fécondé. Le volume de solution d'ADN qui a été injecté a été de l'ordre des picolitres, et la concentration de l'ADN utilisée a varié de 1 à 5ng/µl ; la réimplantation des œufs viables dans femelles B6CBAF1 pseudo-gestantes. Des mâles B6CBA ont été utilisés afin d'obtenir des mâles vasectomisés.

Dans la thèse on a réalisé trois procédures de transgénèse - deux pour le transgène TRE-hapoE3 et une pour le transgène de Tek-Tet On.

C. Identification des fondateurs – le génotypage par PCR des progénitures de la première génération et l'identification des animaux positifs pour les transgènes d'intérêt. Dans les expériences de transgénèse on a réussi d'obtenir un fondateur qui sera utilisé pour créer une lignée des souris transgéniques pour TRE-hapoE3 qui peut être utilisée pour obtenir des souris double transgéniques exprimant l'ApoE3 humaine à la suite de l'induction par Dox .

CONCLUSIONS GENERALES. Cette thèse aborde un sujet d'actualité dans le domaine des sciences biomédicales, à savoir la recherche des nouvelles méthodes de prévention et de ralentir le processus d'athérosclérose.

La thèse propose une nouvelle stratégie pour cibler l'activité de la NADPH oxydase pour améliorer la production des ERO vasculaires dans des conditions d'hypercholestérolémie. Les résultats ont montré qu'une telle approche, dans ce cas, le ciblage des voies de signalisation qui contrôlent la fonction de la NADPH oxydase, fournit une thérapie valable. Plus précisément, la modulation des voies de signalisation activées par Jak peut représenter une nouvelle stratégie pharmacologique pour contrer les effets nuisibles du stress oxydatif dans l'athérosclérose.

Le document propose également deux stratégies pour investiguer la manière dont on peut moduler l'efflux des particules de lipoprotéines accumulées dans les cellules spumeuses dans la plaque et dans l'espace sous-endothélial, en augmentant l'expression de la protéine apoE, dont les fonctions anti-athérogènes sont bien connues. La premiere strategie identifie les rétinoïdes et la vitamine A comme mediateurs de l'expression du gène de l'apolipoprotéine E dans les macrophages, et montre que ces composés peuvent induire une expression accrue du gène apoE endogène dans les macrophages à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les résultats suggèrent que ces composés peuvent avoir un usage thérapeutique pour la régulation du métabolisme lipidique et dans la prévention et / ou l'amélioration de l'athérosclérose.

La seconde stratégie fait référence à l'induction de l'expression du gène de l'apoE dans les cellules endothéliales, et propose la génération d'un modèle murin transgénique de type conditionnel, dans lequel on puisse induire d'une manière contrôlé l'expression de l'isoforme E3 d'apoE humaine, en l'absence de gène apoE murine endogène. Dans la présente étude on a parcouru les trois premières étapes de l'élaboration d'un tel modèle, et on a obtenu et testé aces succès les transgènes nécessaires. Dans les expériences de transgénèse a réussi à obtenir un fondateur qui sera utilisé pour fonder une lignée de souris transgéniques pour TRE- hapoE3 qui peut être utilisée pour obtenir des souris double transgéniques exprimant l'ApoE3 humain induite par Dox. La création de ce modèle permettra l'investigation de la fonction d'apoE dans l'athérosclérose et la façon dont une augmentation de la concentration de

cette protéine dans la plaque, aussi que dans la circulation, peut améliorer le processus pathologique.

ACADEMIA ROMÂNĂ

INSTITUTUL DE BIOLOGIE ŞI PATOLOGIE CELULARĂ

„NICOLAE SIMIONESCU”

INTERVENŢII MOLECULARE ASUPRA EXPRESIEI DE PROTEINE PRO ŞI ANTI-ATEROGENE ÎN VEDEREA AMELIORĂRII ATEROSCLEROZEI

Conducător ştiinţific

Acad. Dr. Maya Simionescu

Doctorand

Ioana Mădălina Fenyo

BUCUREŞTI

2013

CUPRINS

Cuvânt Înainte 3

Lista abrevierilor 4

INTRODUCERE 6

I. PARTEA I – Stadiul actual al cunoștințelor 8

I.1. Capitolul I – NADPH oxidazele - promotori ai stresului oxidativ în ateroscleroză 9

I.1.1. Modificări induse de stresul oxidativ în ateroscleroză 9

I.1.2. Surse generatoare de specii reactive de oxigen în vasculatură 11

I.1.3. Caracterizarea structurală şi funcţională a NADPH oxidazelor vasculare 14

I.1.4. Distribuţia NADPH oxidazelor în peretele vascular 19

I.1.5. Reglarea exprimării şi a activităţii NADPH oxidazelor la nivel vascular 23

I.1.6. Metode de inhibare a activităţii NADPH oxidazelor pentru reducerea stresului oxidativ 27

I.2. Capitolul II – Apolipoproteina E – rol şi implicaţii în ateroscleroză 33

I.2.1. Caracterizarea structurală şi funcţională a apolipoproteinei E 34

I.2.2. Rolul apoE în metabolismul lipoproteic 41

I.2.3. Rolul apoE în ateroscleroză 43

I.2.4. Modele experimentale murine pentru studiul apoE 48

II. PARTEA a II-a – Contribuţii originale 55

Ipoteză şi obiective 56

II.1. Obiectivul I – Reducerea stresului oxidativ în ateroscleroză prin inhibarea activitatii NADPH oxidazei 58

II.1.1. Introducere 58

II.1.2. Materiale și metode 59

II.1.3. Rezultate și discuții 69

II.1.3.1. Evaluarea stării de stres oxidativ şi inflamator în peretele vascular al şoarecilor hipercolesterolemici 69

II.1.3.2. Efectul administrării tirfostinei AG490 asupra exprimării

şi activităţii NAPDH oxidazei în aorta şoarecilor ApoE$^{-/-}$ hipercolesterolemici 76
II.1.3.3. Efectul administrării compusului WP1066 asupra exprimării şi activităţii NAPDH oxidazei în aorta şoarecilor ApoE$^{-/-}$ hipercolesterolemici 86
II.1.4. Concluzii si perspective 90
II.2. Obiectivul 2 – Elaborarea unor strategii pentru creșterea expresiei apolipoproteinei E în celule implicate în placa de aterom 93
II.2.1. Studiul modulării de către retinoizi a exprimării genei apolipoproteinei E în macrofage 94
II.2.1.1. Introducere 94
II.2.1.2. Materiale şi metode 95
II.2.1.3. Rezultate şi discuţii 101
II.2.1.4. Concluzii şi perspective 105
II.2.2. Generarea unui model murin transgenic, de tip condiţional, pentru inducerea controlată a expresiei izoformei E3 a apolipoproteinei E umane în mod specific în endoteliul vascular 106
II.2.2.1. Introducere 106
II.2.2.2. Materiale şi metode 110
II.2.2.3. Rezultate şi discuţii 137
II.2.2.4. Concluzii şi perspective 160
C. CONCLUZII GENERALE 161
D. BIBLIOGRAFIE 164
E. LISTA LUCRARILOR PUBLICATE SI COMUNICATE 176

CUVINTE CHEIE: boli cardiovasculare, ateroscleroză, stres oxidativ, NADPH oxidaze, AG490, WP1066, şoareci apoE deficienţi, apolipoproteina E, macrofage, retinoizi, transgeneză, terapii alternative

REZUMAT

Ateroscleroza este o boală complexă caracterizată prin acumularea în peretele arterial de depozite lipidice, care în timp se transformă în plăci avansate, complexe ca arhitectură și compoziție celulară și moleculară, care perturbă fluxul de sânge normal, putând genera, ca urmare a eroziunii sau rupturii lor, sindroame coronariene acute precum infarctul de miocard și accidentul vascular cerebral.

De-a lungul timpului au fost propuse mai multe ipoteze pentru a explica formarea plăcilor aterosclerotice. Astăzi, relația cauzală dintre hipercolesterolemie, dezvoltarea leziunilor aterosclerotice și bolile cardiovasculare este universal dovedită și acceptată. Cu toate acestea, așa-numită „ipoteză a colesterolului" nu poate ilustra în mod exclusiv complexitatea procesului patologic în ateroscleroză, care cuprinde, între altele, activarea și disfuncția celulelor endoteliale (CE), precum și procesul inflamator cu rol major în toate fazele lezionale („ipoteza răspunsului la lezare"), retenția în spațiul subendotelial al lipoproteinelor aterogene („ipoteza răspunsului la retenție") şi modificările lor oxidative („ipoteza modificării oxidative").

Mai mult decât atât, multitudinea datelor științifice acumulate până în prezent demonstrează că ateroscleroza este o boală multifactorială la care contribuie și o serie de alți factori de risc, cum ar fi hipertensiunea arterială, hiperglicemia și diabetul zaharat, obezitatea, fumatul și istoricul familial.

Abordările folosite în prezent în terapia în ateroscleroză vizează în principal reglarea metabolismului colesterolului și a metabolismului lipoproteic, reducerea procesului inflamator sau prevenția complicațiilor de tip trombotic. Totuși, aceste terapii nu dau rezultate la toți pacienții. În consecință, pentru a crește eficiența tratamentului este nevoie de găsirea de metode terapeutice alternative.

Diferitele strategii terapeutice folosite până în prezent pentru contracararea stresului oxidativ s-au concentrat în principal pe folosirea suplimentelor de antioxidanţi și vitamine sau pe găsirea de inhibitori selectivi ai diferitelor surse enzimatice de specii reactive de oxigen (SRO). Deși promițătoare la început, terapia cu antioxidanți nu a dat rezultatele scontate în câteva trialuri clinice randomizate pentru că acești compuși

acționează doar ca scavengeri de SRO și nu ca modulatori în procesele de semnalizare redox intracelulare care au loc la nivelul peretelui vascular.

Datorită contribuției lor majore la generarea de SRO și implicării lor în medierea semnalelor induse de diferiți factori de risc cardiovascular, inhibarea farmacologică a enzimelor NADPH oxidaze (Nox) vasculare este considerată a fi o strategie atractivă și potențial mai eficientă pentru combaterea stresului oxidativ asociat cu diverse stări patologice.

Ca alternativă la inhibarea directă a NADPH oxidazelor, se pot lua în considerare ca opțiuni eficiente efectele pleiotropice ale unor medicamente convenționale folosite în afecțiuni cardiovasculare (de exemplu, statine, inhibitori ai enzimei de conversie a angiotensinei, blocanți ai receptorului la angiotensină II, tiazolidindione), sau *țintirea unor căi de semnalizare specifice implicate în reglarea exprimării si activităţii NADPH oxidazelor*.

Drept urmare, primul obiectiv al lucrării de faţă este „*Reducerea stresului oxidativ în ateroscleroză prin inhibarea activităţii NADPH oxidazei*".

Pe de altă parte, un proces profund afectat în ateroscleroză este efluxul particulelor de lipoproteine din spaţiul subendotelial şi din celulele spumoase formate la nivelul leziunilor aterosclerotice. O posibilă abordare pentru ameliorarea acestui aspect este *creşterea exprimării unor proteine cu implicate în proces şi care au o acţiune benefică în ateroscleroză, precum apolipoproteina E*.

Drept urmare, cel de-al doilea obiectiv al lucrării de faţă este „*Elaborarea unor strategii pentru creșterea expresiei apolipoproteinei E în celule implicate în placa de aterom*".

Lucrarea este structurată în două părţi principale şi un capitol de concluzii generale.

PARTEA I – Stadiul actual al cunoştinţelor, reprezintă o trecere în revistă a datelor din literatură privind cele două proteine studiate şi implicarea lor în ateroscleroză. Partea I este compusă din două capitole.

Capitolul 1 – NADPH oxidazele - promotori ai stresului oxidativ în ateroscleroză, prezintă date de literatură legate de: modificările induse de stresul oxidativ în ateroscleroză; sursele generatoare de SRO la nivel vascular; caracterizarea structurală şi funcţională a NADPH oxidazelor; distribuţia NADPH oxidazelor în peretele

vascular; reglarea exprimării şi a activităţii NADPH oxidazelor la nivel vascular, şi metode de inhibare a activităţii NADPH oxidazelor pentru reducerea stresului oxidativ.

Capitolul 2 – Apolipoproteina E – rol şi implicaţii în ateroscleroză, prezintă date de literatură legate de: caracterizarea structurală şi funcţională a genei şi a proteinei apo E, izoformele apoE, receptorii pentru apoE; rolul apoE în metabolismul lipoproteic; rolul apoE în ateroscleroză; caracteristicile exprimării şi secreţiei de apoE de către macrofage, şi modele experimentale murine pentru studiul apoE.

PARTEA a II-a – Contribuţii originale, însumează datele experimentale adunate pentru îndeplinirea a două obiective principale.

Obiectivul I – Reducerea stresului oxidativ în ateroscleroză prin inhibarea activităţii NADPH oxidazei, a urmărit investigarea potențialului pe care doi inhibitori farmacologici ai căii de semnalizare Jak2, compuşii AG490 şi WP1066, îl au pentru reducerea SRO generate de NADPH oxidaze și pentru reducerea dezvoltării leziunilor aterosclerotice în șoareci ApoE deficienţi (apoE$^{-/-}$) hipercolesterolemici.

1. Evaluarea stării de stres oxidativ şi inflamator în peretele vascular al şoarecilor hipercolesterolemici. Experimentele au arătat că hipercolesterolemia este asociată cu stres oxidativ şi inflamator crescut în aortele şoarecilor hipercolesterolemici. Acest lucru este demonstrat printr-o creştere semnificativă a nivelelor de exprimare genică şi proteică a tuturor izoformelor Nox, caracteristică atât stadiilor incipiente, cât şi stadiilor mai avansate ale aterosclerozei. Această creştere se traduce printr-o producţie susţinută de SRO în peretele vascular.

2. Efectul administrării tirfostinei AG490 asupra exprimării şi activităţii NAPDH oxidazei în aorta şoarecilor ApoE$^{-/-}$ hipercolesterolemici. Experimentele au demonstrat că tratarea şoarecilor ApoE$^{-/-}$ hrăniţi cu dietă hipercolesterolemică cu tirfostina AG490 a redus semnificativ activitatea Nox şi a determinat scăderea nivelelor de exprimare a ARNm şi la nivel proteic a fiecărei izoforme Nox. De asemenea, administrarea AG490 la şoarecii ApoE$^{-/-}$ hipercolesterolemici a indus o reducere semnificativă a infiltrării macrofagelor în peretele aortic, comparativ cu animalele injectate cu vehicul. În concordanţă cu această observaţie, analiza morfometrică a leziunilor a demonstrat o reducere semnificativă a leziunilor timpurii în aortele totale şi în cârja aortică la animalele tratate cu AG490 comparativ cu şoarecii ApoE$^{-/-}$ hrăniţi cu dietă hipercolesterolemică.

3. Efectul administrării compusului WP1066 asupra exprimării şi activităţii NAPDH oxidazei în aorta şoarecilor ApoE$^{-/-}$ hipercolesterolemici. Rezultatele obținute au demonstrat că tratamentul cu WP1066 scade semnificativ activitatea Nox și nivelele de exprimare ale ARNm pentru izoformele Nox1 și Nox4. Totodata, inhibarea farmacologică a Jak2 de către WP1066 a redus ușor aria de extindere a leziunilor aterosclerotice, dar nu semnificativ.

Rezultatele obţinute în experimentele realizate în cadrul Obiectivului 1 reprezintă primul studiu care demonstrează faptul că AG490 are efect anti-aterosclerotic şi anti-oxidant *in vivo* prin reglarea enzimelor Nox, evidenţiând un nou mecanism al acţiunii tirfostinelor la nivelul sistemului cardiovascular. Împreună, toate aceste rezultate sugerează că modularea căilor de semnalizare activate de Jak poate reprezenta o nouă strategie farmacologică pentru contracararea efectelor nocive ale stresului oxidativ în ateroscleroză.

Obiectivul 2 – Elaborarea unor strategii pentru creșterea expresiei apolipoproteinei E în celule implicate în placa de aterom, a urmărit să găsească modalități prin care să poată fi crescută sau indusă expresia apoE în peretele arterial. Pentru aceasta, experimentele au vizat două tipuri celulare implicate în dezvoltarea și progresia leziunilor aterosclerotice, în speță macrofagele și CE.

1. Studiul modulării de către retinoizi a exprimării genei apolipoproteinei E în macrofage. Exprimarea selectivă a apoE în macrofage are potențial pentru reducerea riscului cardiovascular. Țintirea unor procese precum exprimarea și secreția apoE în macrofage permite pe de-o parte investigarea rolului pe care apoE secretat de acestea îl are în economia plăcii de aterom, iar pe de altă parte poate reprezenta o strategie terapeutică în ateroscleroză. Studiul de față și-a propus să afle dacă există un efect direct al retinoizilor asupra exprimării genei apoE în macrofage și să investigheze mecanismul implicat. Rezultatele obținute demonstrează faptul că retinoizii induc creșterea exprimării endogene a genei apoE în macrofage, atât *in vitro*, cât și *in vivo*. Astfel, acidul 9-cis-retinoic induce creșterea nivelului de ARNm al apoE în linia de macrofage murine RAW 264.7, iar vitamina A creste exprimarea genei apoE în macrofagele peritoneale de șoarece. Acidul 9-cis-retinoic nu acționează direct asupra promotorului genei, ci își exercită efectul asupra multienhancerului ME.2, prin intermediul căruia induce creșterea semnificativă a activității promotorului, creștere

demonstrată în experimentele de transfecţie prin creșterea activității luciferazei. Analiza unei serii de mutanți de deleţie ai ME.2 au indicat existența unui sit de legare pentru RXR în regiunea 405 – 420 a ME.2. Creșterea expresiei apoE în macrofage reprezintă un nou efect cu potențial benefic al retinoizilor, sugerând că acești compuși ar putea avea o utilizare terapeutică pentru reglarea metabolismului lipidic, precum și în prevenția și/sau ameliorarea aterosclerozei.

2. Generarea unui model murin transgenic, de tip condiţional, pentru inducerea controlată a expresiei izoformei E3 a apolipoproteinei E umane în mod specific în endoteliul vascular. CE nu exprimă apoE, însă exprimă receptori din familia LDLR care recunosc și leagă apoE. Mai mult decât atât, CE sunt capabile să facă transcitoză, transportând macromolecule între sânge și spațiul subendotelial. Având în vedere aceste caracteristici funcționale ale CE, inducerea exprimării genei apoE în endoteliu ar putea contribui pe de-o parte la creșterea concentrației plasmatice de apoE, accentuând efectele benefice ale acesteia la nivel sistemic, iar pe de altă parte, la creșterea concentrației de apoE în placă, unde aceasta ar putea participa activ la efluxul de lipoproteine din spațiul subendotelial.

Principiul mecanistic care a stat la baza generarii acestui model a fost acela al transactivării transcripţionale dependente de tetraciclină. In experimentele prezentate in lucrarea de fata am folosit sistemul binar de exprimare genică Tet-On 3G (Clontech) pentru a produce două transgene:

(i) transgena Tek/Tie2promoter-Tet3G-Tek/Tie2enhancer (denumită scurt Tek-Tet3G) (5200pb) care conţine gena pentru proteina transactivator Tet-On3G sub controlul promotorului specific endotelial Tek/Tie2 care asigură exprimarea în mod specific în endoteliu. Transgena conţine şi enhancerul specific endotelial Tek/Tie2, care reglează activitatea promotorului asigurând o expresie susţinută.

(ii) transgena TRE-hapoE3 (5523pb) care conţine gena de interes pentru izoforma apoE3 umană sub controlul promotorului inductibil P_{TRE3G}.

În prezența inducătorului doxiciclină (Dox), un derivat sintetic al tetraciclinei, Tet-On 3G se leagă specific la P_{TRE3G} și activează transcrierea genei de interes. P_{TRE3G} nu conţine situri de legare pentru factori de transcriere endogeni mamiferi, astfel că este practic inactiv în absența inducătorului Dox.

Fiecare dintre cele două transgene a fost folosită pentru crearea unui animal transgenic: un şoarece care să poarte transgena Tek-Tet3G şi un şoarece care să poarte transgena TRE-hapoE3. Prin împerecherea celor două animale se va obţine un şoarece dublu transgenic care va purta ambele transgene şi care va exprima izoforma apoE3 umană doar atunci când i se va administra tratament cu Dox.

Pentru a obţine expresia izoformei apoE3 umane în absenţa genei apoE endogene murine, acest şoarece dublu transgenic va fi împerecheat cu şoarecele $ApoE^{-/-}$ deficient în apoE.

În lucrarea de faţă sunt prezentate primele trei etape din obţinerea acestul model, şi anume:

A. Obţinerea transgenelor – pentru realizarea construcţilor pentru transgeneză s-au folosit tehnici clasice de clonare moleculară (transformare bacteriană, digestia enzimatică, defosforilare, ligare). În studiul de faţă s-au obţinut cu succes transgenele necesare generării unui model murin transgenic, de tip condiţional, în care expresia izoformei apoE3 umane să poată fi indusă în mod controlat, în absenţa genei apoE endogene murine. Funcţionalitatea construcţilor realizaţi a fost demonstrată prin rezultatele obţinute după transfectarea mai multor tipuri celulare cu plasmidele care conţin transgenele, urmată de cultivarea celulelor în mediu suplimentat sau nu cu Dox. Funcţionalitatea şi specificitatea promotorului endotelial Tek/Tie2 a fost de asemenea demonstrată prin măsurarea capacităţii sale de a activa transcrierea genei luciferazei în mod specific în celule de tip endotelial.

B. Transgeneza – procedura propriu-zisă de transfer a transgenelor în animal. Metoda folosită în studiul de faţă pentru obţinerea animalelor transgenice a fost transgeneza clasică, metodă ce presupune microinjectarea pronucleară de ADN.

Pentru procedura de transgeneză s-au folosit patru tipuri de animale : femele donatoare de ovule fecundate; masculi fertili folosiţi pentru obţinerea de ovule fecundate; femele pseudo-gestante folosite drept mame surogat; masculi vasectomizaţi folosiți pentru obținerea de femele pseudo-gestante. Procedura de transgeneză a presupus: prelevarea de ovule fecundate după inducerea în prealabil a supraovulaţiei cu hormonii placentari la femele donatoare de ovule fecundate, din linia consangvină FVB; transferul de ADN (cele două transgene liniarizate și purificate) s-a făcut prin microinjectare în pronucleul mascul al unui ovul fecundat. Volumul de soluție de ADN

injectat per ovul a fost de ordinul picolitrilor, iar concentrația de ADN folosită a variat între 1 și 5ng/µl; reimplantarea ovulelor viabile în femele B6CBAF1 pseudogestante. Pentru obținerea de masculi vasectomizaţi s-au folosit masculi B6CBA.

În lucrarea de față, s-au realizat trei runde de transgeneză – două pentru transgena TRE-hapoE3 și una pentru transgena Tek-TetOn.

C. Identificarea fondatorilor – genotiparea prin PCR a puilor rezultați în prima generație și identificarea animalelor pozitive pentru transgenele de interes. În cadrul experimentelor de transgeneză s-a reușit obținerea unui fondator care va fi folosit mai departe pentru întemeierea unei linii de șoareci transgenici pentru TRE-hapoE3 care să poată fi folosită pentru obținerea șoarecelui dublu transgenic în care exprimarea apoE3 umane să poată fi indusă prin administrarea de Dox.

CONCLUZII GENERALE. Teza de față abordează un subiect de actualitate în domeniul științelor biomedicale, și anume găsirea de metode noi, alternative, pentru prevenirea și încetinirea procesului aterosclerotic.

Lucrarea propune o nouă strategie de țintire a activității NADPH oxidazei în vederea ameliorării producției de SRO la nivel vascular în condiții de hipercolesterolemie. Rezultatele obținute au demonstrat că o astfel de abordare, în speță țintirea căilor de semnalizare care controlează funcția NADPH oxidazei, oferă o perspectivă valabilă pentru terapie. În mod specific, modularea căilor de semnalizare activate de Jak poate reprezenta o nouă strategie farmacologică pentru contracararea efectelor nocive ale stresului oxidativ în ateroscleroză.

Lucrarea propune de asemenea două strategii care au vizat modul în care poate fi modulat efluxul particulelor de lipoproteine acumulate în celulele spumoase din placă și în spațiul subendotelial prin creșterea exprimării proteinei apoE, o proteină cu bine cunoscute funcții anti-aterogene. Prima dintre ele identifică vitamina A și retinoizii ca modulatori ai exprimării genei apolipoproteinei E în macrofage și demonstrează că acești compuși pot induce creșterea exprimării endogene a genei apoE în macrofage, atât *in vitro*, cât și *in vivo*. Rezultatele sugerează că acești compuși ar putea avea o utilizare terapeutică pentru reglarea metabolismului lipidic, precum și în prevenția și/sau ameliorarea aterosclerozei.

A doua strategie se referă la inducerea exprimării genei apoE în celulele endoteliale și propune generarea unui model murin transgenic, de tip condițional, în

care expresia izoformei apoE3 umane să poată fi indusă în mod controlat, în absența genei apoE endogene murine. În studiul de față s-au parcurs primele trei etape ale procesului de dezvoltare a unui astfel de model, obținându-se și testându-se cu succes transgenele necesare. În cadrul experimentelor de transgeneză s-a reușit obținerea unui fondator care va fi folosit mai departe pentru întemeierea unei linii de șoareci transgenici pentru TRE-hapoE3 care să poată fi folosită pentru obținerea șoarecelui dublu transgenic în care exprimarea apoE3 umane să poată fi indusă prin administrarea de Dox. Crearea acestui model va oferi posibilitatea investigării funcției apoE în ateroscleroză și al modului în care o creștere a concentrației acestei proteine la nivelul plăcii, dar și în circulație, poate ameliora procesul patologic.

DISSEMINATION:

Indexed publications:

1. Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, "Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders?", J Cell Mol Med. 2012 ;16(9):1978-90
2. Maria Mihaly, Madalina Camelia Fleancu, Nicoleta Liliana Olteanu, Dionezie Bojin, Aurelia Meghea, Marius Enachescu, Synthesis of gold nanoparticles by microemulsion assisted photoreduction method, Comptes Rendus Chimie, 2012, vol.15: 1012-1021.
3. Madalina Fleancu, Maria Mihaly, D. Bojin, M. Enachescu, Liana Anicai, Study of Electrocatalytic Characteristics of Au nanoparticles prepared by microemulsion assisted photoreduction procedure, REV. CHIM. (Bucharest) vol. 63 (12): 1261-1265, 2012
4. Daniela Stan, Viorel Simion, Ana-Maria Gan, Monica Pirvulescu, Elena Butoi, Ileana Manduteanu, Manuela Calin, Monocyte infiltration through endothelial cell monolayer studied by a real-time electrical impedance assay, Annals of Romanian Society of Cell Biology vol. XVII nr. 2/2012.
5. K. Reder-Christ, P.Schmitz, P.M. Bota, U. Gerber, H.Falkenstein-Paul, C.Fuss, M. Enachescu, G. Bendas, Dry Membrane Protection Technique to Allow Surface Acoustic Wave Biosensor Measurements of Biological Model Membrane Approaches, Sensors, vol. 13, pp. 12392-12405, (2013)
6. Viorel Simion, Daniela Stan, Ana-Maria Gan, Monica Madalina Pirvulescu, Elena Butoi, Ileana Manduteanu, Mariana Deleanu, Eugen Andrei, Anamaria Durdureanu-Angheluta, Marian Bota, Marius Enachescu, Manuela Calin, Maya Simionescu, Development of curcumin-loaded poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanoparticles as anti-inflammatory carriers to human activated endothelial cells, Journal of Nanoparticle Research, 2013, DOI: 10.1007/s11051-013-2108-1

Books and chapters in books:

1. Manuela Calin, Immunoliposomes for Specific Drug Delivery, in Antibody-Mediated Drug Delivery Systems: Concepts, Technology, and Applications (eds Y. Pathak and S. Benita), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2012. doi: 10.1002/9781118229019.ch12

Congresses and Conferences:

1) M. Calin, D. Stan, I. Manduteanu, V. Simion, M. Pirvulescu, A.M. Gan, M. Simionescu, Design, preparation and characterization of site-specific target-sensitive liposomes for drug delivery at sites of activated endothelium", "Bioactive/biocompatible polymeric materials" Conference, 6-13 martie 2011, Zabrze, Polonia- oral presentation

2) Manuela Calin, Daniela Stan, Ileana Manduteanu, Viorel Simion, Monica Pirvulescu, Ana-Maria Gan, Maya Simionescu, Development and characterization of site-specific target-sensitive liposomes for drug delivery at sites of activated endothelium, "Third International Congress of Romanian Society for Cell Biology", Arad/Szeged, Romania/Hungary, 8 -12 iunie 2011-poster; **Best poster award**
3) Daniela Stan, Ileana Manduteanu, Viorel Simion, Ana-Maria Gan, Monica Pirvulescu, Manuela Calin, Selective induction of apoptosis in monocytes by clodronate-liposomes to study the changes in their adhesion properties and consequent activation of vascular cells, "BIT Life Sciences' 2nd Annual Nanomedicine-2011", Shenzhen, China, 3-5 noiembrie 2011- poster presentation
4) Viorel Simion, Daniela Stan, Ana-Maria Gan, Monica Pirvulescu, Ileana Manduteanu, Anamaria Durdureanu-Angheluta, Manuela Calin. Development of curcumin loaded polymer and lipid-based nanoparticles as anti-inflammatory carriers, "BIT Life Sciences' 2nd Annual Nanomedicine-2011", Shenzhen, China, 3-5 noiembrie 2011- poster presentation
5) Viorel Simion, Daniela Stan, Ana-Maria Gan, Monica Pirvulescu, Ileana Manduteanu, Manuela Calin, Preparation and characterization of different types of curcumin loaded nanoparticles, "Third International Congress of Romanian Society for Cell Biology", Arad-Szeged, Romania, 8 -12 iunie 2011- poster presentation
6) Daniela Stan, Viorel Simion, Ana-Maria Gan, Monica Pirvulescu, Elena Butoi, Ileana Manduteanu, Manuela Calin, Chemokine receptor antagonists influence on monocytes infiltration through endothelial cells monolayer studied by a real-time electrical impedance assay, poster, "5th Annual Meeting of the Diabetes & Cardiovascular Disease, EASD Study group ", Paris, France, 15-17. 11. 2012 -poster presentation
7) M. Calin, Transportul de medicamente folosind liposomi directionati specific, Scoala de Studii Avansate "Nicolae Simionescu": Noi abordari de biologie celulara si moleculara pentru progresul cercetarii biomedicale, 5-14 noiembrie 2012, Bucuresti- oral presentation
8) Manuela Calin, Ileana Manduteanu , Elena Butoi , Daniela Stan, Viorel Simion, Ana-Maria Gan, Monica Pirvulescu, Maya Simionescu, Nanoparticles designed to target inflammatory processes in cardiovascular diseases, oral presentation at "Nanomedicine, Nanotechnologies and Biomaterials Symposia", „4th International Congress and 29th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology", Satu Mare, Romania, 13-17.06.2012- oral presentation
9) Viorel Simion, Daniela Stan, Ana-Maria Gan, Monica Pirvulescu, Elena Butoi, Ileana Manduteanu, Manuela Calin, Development of polymer and lipid-based nanoparticles as anti-inflammatory drug carriers, oral presentation at "Nanomedicine, Nanotechnologies and Biomaterials Symposia", „4th International Congress and 29th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology", Satu Mare, Romania, 13-17.06.2012- - oral presentation
10) Daniela Stan, Viorel Simion, Ana-Maria Gan, Monica Pirvulescu, Elena Butoi, Ileana Manduteanu, Manuela Calin, Monocyte infiltration through endothelial cell monolayer studied by a real-time electrical impedance assay, poster, „4th International Congress and 29th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology", Satu Mare, Romania, 13-17.06.2012.

11) Viorel Simion, Daniela Stan,I. Manduteanu, M.Calin, M. Simionescu, Curcumin-loaded nanoparticles as anti-inflammatory drug carriers, poster, the 4th EMBO meeting Advancing the life sciences, Nice, France, 22-25.09. 2012
12) Daniela Stan, Viorel Simion, Ana-Maria Gan, Monica Pirvulescu, Elena Butoi, Ileana Manduteanu, Manuela Calin. Monocyte infiltration through endothelial cell monolayer studied by a real-time electrical impedance assay. „RAMSES Annual Workshop" 13-16 septembrie 2012 Bucuresti, Romania, poster presentation
13) Madalina Fleancu, Maria Mihaly, D.Bojin, M.Enachescu, Liana Anicai, Study of electrocatalytic characteristics of au nanoparticles prepared by microemulsion assisted photoreduction procedure, poster "Third regional symposium on electrochemistry: South-East Europe (Rse-See3), Bucharest, May 13-17, 2012
14) Madalina Fleancu, Maria Mihaly, D.Bojin, Liana Anicai, M.Enachescu, Electrocatalytic characteristics of gold nanoparticles prepared by microemulsion assisted photoreduction procedure– application in bioanalytical detection, poster, The 63rd Annual ISE Meeting, Prague, August 19-24, 2012
15) Liana Anicai, Maria Mihaly, Madalina Fleancu, Dionezie Bojin, Marius Enachescu, Electrocatalytic gold nanoparticles obtained by microemulsion assisted photoreduction – application in bioanalytical detection, 1st International Conference on Analytical Chemistry „Analytical Chemistry for a Better Life", Targoviste, Romania, September 18-21, 2012, **Best poster award**
16) Daniela Stan, Viorel Simion, Mariana Deleanu, Ana-Maria Gan, Monica Pirvulescu, Elena Butoi, Ileana Manduteanu, Manuela Calin, Maya Simionescu. Liposomes targeted to vascular cell adhesion molecule- 1 bind specifically to the aorta of apoe-deficient mice. International Congress and the 31th Annual Session of Romanian Society for Cell Biology, 5-9 iunie 2013 Timisoara, **Best poster award**
17) Viorel Simion, Daniela Stan, Monica Pirvulescu, Ana-Maria Gan, Elena Butoi, Ileana Manduteanu, Manuela Calin. Anti-inflammatory and anti-tumoral activity of curcumin-encapsulated lipid nanoparticles. International Congress and the 31th Annual Session of Romanian Society for Cell Biology, 5-9 iunie 2013 Timisoara.
18) Viorel Simion, Daniela Stan, Monica Pirvulescu , Anca Gan, Elena Dragomir, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Nanoparticles designed to treat atherosclerosis and cancer, Congresul FEBS, 6-11 iulie 2013, Sankt Petersburg, Rusia

Patents:

1. European Patent Office: application no. EP13003858: "Method to block site-specifically chemokine-related inflammatory processes in vascular diseases and metastasis".

Applicants:

- Institute of Cellular Biology and Pathology 'Nicolae Siminescu', 8 BP Hasdeu Street, PO Box 35-14, Bucharest, Romania

- University Politehnica of Bucharest; Splaiul Independentei 313, JE 105, 060042 Bucharest, Romania
- University of Bonn, An der Immenburg 4, 53121 Bonn, Germany
- Istanbul University, Beyazit Campus, 34452 Beyazit, Istanbul, Turkey
- Experimentelle Pharmakologie & Onkologie Berlin Buch GmbH, R-Rössle Str. 10, 13122 Berlin, Germany
- University of Zürich, Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich, Switzerland

L'ACADÉMIE ROUMAINE
Institute de Biologie Pathologie Cellulaire
„NICOLAE SIMIONESCU”

THÈSE
-Résumé-Book-

CARACTERISATION FONCTIONNELLE ET STRUCTURALE DES MICRODOMAINES MEMBRANAIRES DANS UN ETAT NORMAL ET PATHOLOGIE
(diabète, hypercholestérolémie, l'athérosclérose)

Directeur de thèse
MM Felicia Antohe

Doctorant
Elena Uyy

BUCAREST
2012

TABLE DES MATIÈRES

PARTIE I - ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR MICRODOMAINES MEMBRANAIRES
I.1. Membrane plasmique et microdomaines lipidiques

I.2. Cavéoles, Microdomaines membranaires hautement spécialisé 7

I.2.1. Introduction……..…...… 10
I.2.2. Cavéoles et leur implication dans la physiologie cardiovasculaire ……..… 16
I.3. Cavéoles dans des cellules endothéliales ……...… 17

I.3.1. Introduction ……...…… 17
I.3.2. L'implication des cavéoles dans la régulation de la perméabilité vasculaire 19
I.3.3. Rôle des cavéoles / cavéoline dans le plasma macromolécules transport et l'homéostasie ……...……. 26
I.3.4 La cavéoline-1 et de l'angiogenèse …….……. 29
I.4. Dysfonctionnement des cellules endothéliales et les cavéoles ……..….. 30

I.4.1 Introduction..... 30

I.4.2 Dysfonction des cellules endothéliales dans les maladies cardiovasculaires et le rôle des cavéoles dans:……...…….. 31
I.4.2.1. diabète …….…… 36
I.4.2.2. hypercholestérolémie / athérosclérose …… 42
I.4.2.3. l'hypertension artérielle ……..……. 49
I.4.2.4. cancer……..……. 58

I.5. Récepteurs et des voies de signalisation impliquées dans la relation des cavéoles / cavéoline et la dysfonction des cellules endothéliales …….…… 61

I.5.1. Récepteurs associés de la membrane cavéoles ……..…..…….. 61
I.5.2. Les voies de signalisation ..…….……... 63
I.5.3. Rôle des cavéoles dans la mobilisation du Ca^{2+} …..……..… 65
I.5.4. Cavéoles, récepteur de folate, le groupement récepteur et la potocytose... 66
I.5.5. Potentiel thérapeutique des conjugués de folate ……... 67
I.6. Conclusions……..... 69

PARTIE II - CONTRIBUTIONS ORIGINALES

II.1. Introduction et objectifs ……..……..... 71

II.2. Méthodologie expérimentale …….……... 73

II.2.1. Les modèles expérimentaux …….…….…… 73
II.2.2 Techniques de la microscopie .……... 75
II.2.2.1. La microscopie électronique et analyse morphométrique …… 75
II.2.2.2. La microscopie optique ……..….. 75
II.2.3. Préparation *d'*extraits cytoplasmiques, nucléaires et membrane protéines 76
II.2.4. Préparation des domaines membranaires enrichies en cavéoline-1 par centrifugation en gradient de saccharose ….. …… 77
II.2.5. Western Blotting …….…... 77
II.2.6 ELISA……...……... 78
II.2.7. Extraction d'ARN et RT-qPCR ……..……...…… 78

II.2.8. LC-MS/MS……..……...… 79
II.2.9. Analyse statistique ……..… 79
II.3. Des études expérimentales …… 80
II.3.1 La cavéoline-1 est associée à des changements structurels dans les cellules endothéliales pulmonaires chez les diabétiques ……... 80
II.3.1.1. Introduction …….…….. 80
II.3.1.2. Les modèles expérimentaux ……..…… 81
II.3.1.3. Résultats et discussion ……... 82
II.3.1.3.1. Caractérisation des modèles expérimentaux …….…….... 82
II.3.1.3.2. Les changements structurels de cellules endothéliales pulmonaires chez les diabétiques ……. 82
II.3.1.3.3. Caractérisation de la cavéoline-1 riche microdomaines membranaires (activité de ACE, le cholestérol, les protéines totales)... 85
II.3.1.3.4. Augmentation de l'expression des protéines de la cavéoline-1 et -2 dans le diabète..... 88
II.3.1.3.5. Augmentation de l'expression du gène de la cavéoline-1 dans le diabète ……...… 91
II.3.1.4. Conclusions……...…. 93
II.3.2. Corrélation de l'expression protéique des protéines de choc thermique ou HSP (pour heat shock protein) et des protéines dans le microdomaines membranaires en hyperlipidémie expérimental……...…… 95
II.3.2.1. Introduction ..……...……... 95
II.3.2.2. Les modèles expérimentaux ……..……...…….. 97
II.3.2.3. Résultats et discussion ……...……. 97
II.3.2.3.1. Hyperlipidémie induite par l'alimentation la formation des plaques athérosclérotique …… 97
II.3.2.3.2. Les changements structurels de l'endothélium pulmonaire en hyperlipidémie……..……... 101
II.3.2.3.3. Caractérisation de la cavéoline-1-riche microdomaines membranaires..... 102
II.3.2.3.4. Caractérisation des fractions enrichies en proteines cytosolique / nucléaire / membrane ……...……...…….. 106
II.3.2.3.5. Hyperlipidémie induit une augmentation de l'expression proteines de la cavéoline-1 dans le microdomaines membranaires.……
II.3.2.3.6. L'expression du gène de la cavéoline-1 dans l'athérosclérose … 108
II.3.2.3.7. L'athérosclérose entraîne une diminution de l'expression des protéines de PTRF dans le microdomaines membranaires enrichie en cavéoline-1…….…….. 109
II.3.2.3.8. L'athérosclérose induit une augmentation de l'expression proteines de RAGE co-fraction avec la cavéoline-1 et l'activation de la voie de signalisation AKT …….. 110 111
II.3.2.3.9. Augmenter l'expression du récepteur de folate dans l'endothélium pulmonaire dans l'athérosclérose …..……..... 114
II.3.2.3.10. Régulation à la hausse des protéines impliquées dans la

dynamine endocytose que la co-fractionnement avec la cavéoline-1 (dynamine, clathrine filamine A)..…….. 115
II.3.2.3.11. La corrélation de la sécrétion de la protéine de choc thermique dans le sérum des animaux hyperlipidémiques avec leur expression dans la membrane cavéoline-1 fractions enrichies ……... 118
II.3.2.4. Conclusions……..……... 121

II.3.3. Absorption accrue de folate conjugués par les macrophages activés hyperlipidémie expérimental..... 125

II.3.3.1. Introduction …….…….. 125
II.3.3.2. Les modèles expérimentaux ……...……...… 127
II.3.3.3. Les procédures expérimentales ……. 127
II.3.3.3.1. La préparation des tissus cryosections avec lésions athéroscléreuses ……. 128
II.3.3.3.2. L'absorption de l'acide folique-Texas Red dans des cultures de macrophages péritonéaux …… 129
II.3.3.3. L'absorption de l'acide folique-FITC / Texas Red par le monocytes U937 …… 129
II.3.3.4. Résultats et discussion ……..... 130
II.3.3.4.1. L'absorption spécifique de l'acide folique-Texas Red dans des cultures de macrophages péritonéaux …..…… 130
II.3.3.4.2. L'absorption de l'acide folique par les cellules associées plaque d'athérome..... 133
II.3.3.4.3. L'absorption spécifique du acid-FITC/Texas folique rouges par la lignée cellulaire U937 ……...…..….. 135
II.3.3.5. Conclusion……..…… 137

II.4. Conclusions générales ……...… 139

II.5. Bibliographie ……..…… 143

II.6. Liste des communiqués publiés et des articles scientifiques …….. 161

MOTS-CLÉS

LES CELLULES ENDOTHÉLIALES,
RADEAUX LIPIDIQUES
LA CAVEOLINE-1,
PTRF,
LE FOLATE RECEPTEUR
LE DIABETE,
L'HYPERLIPIDEMIE,
L'ATHEROSCLEROSE,

PART I
ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR MICRODOMAINES MEMBRANAIRES

La modèle "mosaïque fluide" de membranes cellulaires structurer (ainsi que endomembranes) est basée sur une bicouche lipidique fluide hétérogène, asymétrique, organisé en deux dimensions, un plus: des protéines qui lui confèrent un caractère mosaïque (protéines sont flottantes, ou sont immergés dans une mer de lipides), cytosquelette membranaire associé (une structure située sur la face interne de la membrane) et le glicocalyx (une structure exposée sur la surface extérieure des membranes, composé de chaînes olygo-(poly)-saccharide de composition de glycolipides, les glycoprotéines et les protéoglycanes de la membrane).

En plus du modèle de la "mosaïque fluide" en termes de structure, et de fonction ont été définies les notions de domaines et/ou microdomaines membranaires. Composition et de l'existence de microdomaines (cavéoles, radeaux lipidiques, clathrine structures enrobés) ont un caractère dynamique qui répond à la nécessité constante évolution des cellules, imposée par les activités internes biochimiques, ou par des stimuli externes. Composants de la membrane soit des lipidique, de protéines ou de structures glucides ont deux rôles structuraux et métaboliques. Cette dualité des rôles est valable pour les deux classes de composants de la membrane biochimiques et entités moléculaires (même molécule peut effectuer à la fois structurelle et les fonctions métaboliques) (Pike et al, 2009)

Des progrès significatifs ont été réalisés en biologie moléculaire et cellulaire en 2009, lorsque Pike et ses collaborateurs ont formulé plusieurs questions dont la réponse est demandée, même dans le présent. En bref, les questions portent sur les mécanismes suivants: 1) Comment le niveau de protéine de la membrane modifie en réponse à des stimuli provenant de l'environnement qui affectent la composition et le comportement des "radeaux lipidiques"?, 2) Quelles sont les fonctions physiologiques de les radeaux lipidiques?, 3) Comment est le flux continu des lipides membranaires en, et à partir de la membrane plasmatique de compartiments internes; 4) Comment il affecte le champ d'écoulement de formation et comment l'alimentation ou un traitement médicamenteux pour modifier la composition lipidique en modifiant le fonction des domaines lipidiques?

PARTIE II
CONTRIBUTIONS ORIGINALES

Des expériences réalisées *in vitro* sur des systèmes membranaires que le modèle du *black hole* n'expliquent pas toutes les fonctions complexes de cellules intactes. Dans ce contexte, des expériences *in vivo* ont été réalisées pour l'd'une meilleure compréhension de la physiopathologie de la membrane microdomaines. Notre enquête a montré que:

Dans le diabète insulino-dépendant, les cellules endothéliales expriment un nombre élevé de cavéoles, à exposer une plus grande surface luminale et un complexe membrane interne biosynthétique bien développée. Ces changements sont en corrélation avec l'activité accrue ACE, avec le niveau de cholestérol et de la cavéoline-1 expression qui indiquent une réponse de la CE au stress induit par le glucose élevé et les taux de lipides sériques (Uyy et al., 2010).

Association du diabète de type I et régime alimentaire hyperlipidémie met l'accent sur l'effects induits de diabète dans le tissu pulmonaire.

L'augmentation du cholestérol dans la membrane plasmatique induite par le diabète de type I et / ou l'hyperlipidémie alimentation, indiquant un enrichissement de la membrane de la cellule avec des radeaux lipidiques d 'une composition biochimique de modification qui affecte de manière significative la fluidité et la perméabilité de la membrane cellulaire (Uyy et al., 2010, Uyy et al., in press 2012).

Dans la pathogenèse du diabète sucré insulino-dépendant, augmentation de lexpression de la cavéoline-1, de la concentration du cholestérol et une augmentation ACE activité enzymatique peut provoquer l'inhibition de la eNOS situé sur la face interne de la membrane, suivie d'une réduction de la production de NO, qui aboutira à la dysfonction émergence de cellules endothéliales (Uyy et al., 2010).

Les résultats que nous avons obtenus ont un potentiel appliqué simultanément à travers le ciblage des molécules sur la surface des cellules endothéliales affectée par l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie (ACE, la cavéoline-1), un mécanisme qui pourrait être une stratégie thérapeutique supplémentaire dans le diabète de type I (Uyy et al., 2010).

Les modèles expérimentaux créés à l'aide d'un régime alimentaire hyperlipidémie sur hamsters Dorés Syriens et souris *knockout* dans APO E, ont démontré le développement des lésions d'athérosclérose et l’instalation de pathologie s'accompagne de changements

importants dans la cellule endothéliale (Haraba, Uyy et al., 2011, 2011, Uyy et al., in press 2012).

Hyperlipidémie régime alimentaire induit des changements dans l'expression des protéines membranaires impliquées dans la fission des vésicules de transport, qui cofractionate avec la cavéoline-1. Ces résultats confirment la rapidité au démontage de cavéoles en réponse des cellules endothéliales au stress hyperlipidémie et aussi la redistribution de la cavéoline-1 dans la non-cavéoles "radeaux lipidiques" au niveau du plasmalemme ou des membranes intracellulaires (diminution de l'expression PTRF et la dynamine et expression accrue de protéines de la cavéoline-1 et de filamine A) (Uyy et al., in press 2012).

Les changements induit par la diète hyperlipidémie dans l'expression de protéines qui co-fractionnée avec la cavéoline-1 impliqué dans la fission des vésicules de transport (PTRF, dinamin, clatrin et filamine A) peut être une réponse indirecte de l'internalisation accrue des macromolécules par endocytose dépendante dinamin clathrine au détriment de l'une caveolar dans des conditions pathologiques provoquées par l'athérosclérose chez microvascularisation pulmonaire (Uyy et al., in press 2012).

L'apparition de l'athérosclérose a induit une augmentation a expression RAGE et de récepteurs de folate (FR) qui co-fractionnement avec la cavéoline-1 de la membrane endothéliale pulmonaire par activant la voie de signalisation AKT. Ces mécanismes maintenir et amplifier les processus inflammatoires dans le tissu pulmonaire (Haraba, Uyy et al., 2011, 2011).

Le traitement par statine diminue de manière significative la tendance du récepteur de folate et RAGE à s'accumuler dans les fractions membranaires isolées à partir de l'endothélium pulmonaire et atténue l'activation AKT signalisation et l'inflammation associées à l'athérosclérose.

Le démontage de cavéoles induite par l'hyperlipidémie et la redistribution de la cavéoline-1 dans la non-cavéoles "radeaux lipidiques" ne semble pas influencer l'expression des deux protéines (RAGE et FR) dans la cavéoline-1 positifs fractions membranaires enrichis en "radeaux lipidiques" mais peut être mise en corrélation avec une expression accrue de la protéine cavéoline-1.

L'athérosclérose provoque une sur-expression de HSP 70 et une régulation à la baisse HSP 90 de cofractionate avec la cavéoline-1 dans les fractions membranaires isolées à partir de tissu pulmonaire (Uyy et al., in press 2012).

Le traitement par statine inverse de manière significative les processus induits par l'hyperlipidémie en réduisant la sécrétion sérique de HSP 60 et 70 et en augmentant la sécrétion et cofractionation de HSP 90 avec la cavéoline-1 (Uyy et al., in press 2012)..

L'état hyperlipidémique induit un changement dans l'expression de la protéine de HSP 70 et HSP 90 qui cofractionate avec la cavéoline-1 dans les fractions membranaires qui est en corrélation avec l'expression de la protéine HSP 70 et HSP 90, sécrétée dans le sérum isolé de la même expérimentation animale groupe, ce qui nous amène à émettre l'hypothèse de la participation de la cavéoline-1-positifs “radeaux lipidiques” dans leur sécrétion (Uyy et al., in press 2012).

Parce que les modèles expérimentaux que nous avons utilisés présentent des similitudes avec la pathologie humaine, les données obtenues peuvent être utiles pour la modulation des processus moléculaires à des patients avec diabète de type I et / ou l'athérosclérose.

Le quantitatif (spectrofluorimétrique) et qualitatives (microscopie à fluorescence) a révélé une augmentation significative de la rétention de l'acide folique - conjugués par les macrophages péritonéaux récoltés à partir des hamsters hyperlipidémiques par opposition aux animaux qui ont été entretenus sur soit normal (folate élevée) ou acide folique déficient alimentation (Antohe, Puchianu et al. 2005).

L'analyse histologique a confirmé l'adoption répandue de conjugué folate par les plaques d'athérosclérose peuplées par les macrophages, par rapport aux régions distales qui présentaient un faible niveau de fluorescence (Antohe, Puchianu et al. 2005).

Les expériences réalisées sur des macrophages U937 en culture en utilisant moyenne hyperlipidémie ont confirmé les résultats obtenus *in vivo* (Antohe, Puchianu et al. 2005).

L’augmentation de l'absorption de folate par les macrophages U937 peut être expliquée par l'expression accrue des récepteurs de folate (FR) sur les macrophages activés. Cette augmentation de l'expression FR peut être exploitée dans les ciblées thérapies composés d'acide folique avec de divers médicaments destinés aux lésions athéroscléreuses, riches en macrophages activés (Antohe, Puchianu et al. 2005).

Le concept des microdomaines membranaires que explique la dysfonction des cellules endothéliales dans diverses maladies, est un sujet d'actualité. À cet égard, leur caractérisation teneur en protéines et les possibilités thérapeutiques offertes par les microdomaines membranaires lipidiques pourrait élargir l'arsenal des options de traitement pour les maladies cardio-pulmonaires.

Bibliography

Elena Uyy, Felicia Antohe, Luminita Ivan, Raluca Haraba, Dorel Lucian Radu, Maya Simionescu, Upregulation of caveolina-1 expression is associated with structural modifications of endothelial cells în diabetic lung, Microvascular Research, 79, 154-159, 2010.

Elena Uyy, Luminita Ivan, Raluca Boteanu, Viorel Suica and Felicia Antohe, Heat Shock Proteins and Membrane Caveolins Overexpression în Experimental Hyperlipidemia trimisa spre publicare la Biology of the cell (FI 4,898)

Felicia Antohe, Luminita Radulescu, Elena Puchianu, Michael D. Kennedy, Philip Low, Maya Simionescu - Increased uptake of folate conjugates by activated macrophages în experimental hyperlipemia, Cell Tissue Res., 320(2):277-285, 2005. (FI 2,991)

Pike L. J., The challenge of lipid „raft"s, Journal of Lipid Research, 2009, 50:S323-328

Raluca Haraba, Elena Uyy, Viorel I. Suica, Luminita Ivan, Felicia Antohe - Fluvastatin reduces the high mobility group box 1 protein expression în hyperlipidemia, International Journal of Cardiology, Jul 1;150(1):105-7, 2011, (FI 7,078)

Raluca Haraba, Viorel I. Suica, Elena Uyy, Luminita Ivan, Felicia Antohe, Hyperlipidemia stimulates the extracellular release of nuclear high mobility group box 1 protein, Cell Tissue Res. Dec; 346 (3) : 361-8. 2011 (FI 3,114)

ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOLOGIE ŞI PATOLOGIE CELULARĂ
„NICOLAE SIMIONESCU”

TEZĂ DE DOCTORAT

-Carte rezumat-

CARACTERIZAREA FUNCȚIONALĂ ŞI STRUCTURALĂ A MICRODOMENIILOR MEMBRANARE LIPIDICE ÎN STĂRI NORMALE ŞI PATOLOGICE

(diabet, hipercolesterolemie, ateroscleroză)

Conducător ştiințific
Dr. Felicia Antohe

Doctorand
Elena Uyy

BUCUREŞTI
2012

CUPRINS

PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CUNOŞTINŢELOR PRIVIND MICRODOMENIILE MEMBRANARE

I.1. Membrana plasmatică şi microdomeniile lipidice

I.2. Caveolele, microdomenii membranare înalt specializate..... 7

I.2.1. Introducere……...… 10
I.2.2. Caveolele şi implicarea lor în fiziologia cardiovasculară……..… 16

I.3. Caveolele în celula endotelială……...… 17

I.3.1. Introducere……...…… 17
I.3.2. Implicarea caveolelor în reglarea permeabilității vasculare……..……... 19
I.3.3. Rolul caveolelor/ caveolinelor în transportul şi homeostazia macromoleculelor plasmatice……...…… 26
I.3.4 Caveolina-1 şi angiogeneza ……. 29

I.4. Caveolele şi disfuncția celulei endoteliale ……...…….. 30

I.4.1 Introducere..... 30

I.4.2 Disfuncția celulei endoteliale în boli cardiovasculare şi rolul caveolelor în:…….. 31
I.4.2.1. diabet…… 36
I.4.2.2. hipercolesterolemie/ateroscleroză…… 42
I.4.2.3. hipertensiune arterială……..…… 49
I.4.2.4. cancer……..……. 58

I.5. Receptori şi căi de semnalizare implicate în relația caveolelor/caveolinelor şi disfuncția celulei endoteliale …….…… 61

I.5.1. Receptori asociați membranei caveolare…….……..…….. 61
I.5.2. Căi de semalizare…….……... 63
I.5.3. Rolul caveolelor în mecanismele de mobilizare a Ca^{2+}……..…… 65
I.5.4. Caveolele, receptorul la folat, gruparea receptorilor şi potocitoza……. 66
I.5.5. Potențialul terapeutic al conjugatilor folatului……... 67

I.6. Concluzii……..... 69

PARTEA II - CONTRIBUȚII ORIGINALE

II.1. Introducere şi obiective……..... 71

II.2. Metodologie experimentală……... 73

II.2.1. Modele experimentale…… 73
II.2.2 Tehnici de microscopie……... 75
II.2.2.1. Microscopie electronică şi analiză morfometrică……..…… 75
II.2.2.2. Microscopie optică……..….. 75
II.2.3. Prepararea extractelor îmbogățite în proteine citoplasmatice, nucleare şi membranare…..…….…… 76

II.2.4. Prepararea domeniilor membranare îmbogățite în caveolina-1 prin ultracentrifugare în gradient de sucroză…… 77
II.2.5. Western Blotting ……..…... 77
II.2.6 ELISA……...……... 78
II.2.7. Extracție de ARN şi RT-qPCR……...…… 78
II.2.8. LC-MS/MS……..……...… 79
II.2.9. Analiză statistică……..… 79
II.3.Studii experimentale…… 80
II.3.1 Caveolina-1 este asociată modificărilor structurale ale celulelor endoteliale pulmonare în diabetul zaharat……... 80
II.3.1.1. Introducere…….. 80
II.3.1.2. Modele experimentale…… 81
II.3.1.3. Rezultate şi discuții…….... 82
II.3.1.3.1. Caracterizarea modelelor experimentale……... 82
II.3.1.3.2. Modificări structurale ale celulelor endoteliale pulmonare în diabetul zaharat……. 82
II.3.1.3.3. Caracterizarea microdomeniilor membranare îmbogățite în caveolina-1 (activitate ACE, colesterol, proteină totală) …….. 85
II.3.1.3.4. Creşterea expresiei proteice a caveolinei-1 şi -2 în diabetul zaharat..... 88
II.3.1.3.5. Creşterea expresiei genice a caveolinei-1 în diabetul zaharat…… 91
II.3.1.4. Concluzii……...…. 93
II.3.2. Corelarea expresiilor proteice a proteinelor de şoc termic (HSP) şi a proteinelor „raft”-urilor lipidice în hiperlipidemia experimentală……... 95
II.3.2.1. Introducere……...……... 95
II.3.2.2. Modele experimentale……...…….. 97
II.3.2.3. Rezultate şi discuții…… 97
II.3.2.3.1. Dieta hiperlipidemică induce progresia plăcii aterosclerotice…. 97
II.3.2.3.2. Schimbările structurale ale celulelor endoteliale în plămânul hiperlipidemic...…….... 101
II.3.2.3.3. Caracterizarea microdomeniilor membranare îmbogățite în caveolina-1..... 102
II.3.2.3.4. Caracterizarea fracțiilor îmbogățite în proteine citosolice / nucleare / membranare……...…….. 106
II.3.2.3.5. Hiperlipidemia induce o creştere a expresiei proteice a caveolinei-1 în *„raft”*-urile lipidice…….…… 108
II.3.2.3.6. Expresia genică a caveolinei-1 în ateroscleroză…….. 109
II.3.2.3.7. Ateroscleroza induce o scădere a expresiei proteice a PTRF-ului în *„raft”*-urile lipidice îmbogățite în caveolina-1……. 110
II.3.2.3.8. Ateroscleroza induce o creştere a expresiei RAGE cofracționat cu caveolina-1 şi o activare a căii de semnalizare AKT…….. 111
II.3.2.3.9. Creşterea expresiei receptorilor la folat în endoteliul pulmonar în ateroscleroză……..... 114
II.3.2.3.10. Creşterea expresiei proteinelor implicate în endocitoza

mediată de dinamină cofracționate cu caveolina-1 (dinamina, filamina A, clatrina)…… 115
II.3.2.3.11. Corelarea secreției proteinelor de şoc termic în serul animalelor hiperlipidemice cu expresia lor în fracțiile membranare îmbogățite în caveolina-1…… 118
II.3.2.4. Concluzii……..…….... 121

II.3.3. Absorbția crescută a conjugaților acidului folic de către macrofagele activate în condiții de hiperlipemie……. 125

II.3.3.1. Introducere…….. 125
II.3.3.2. Modele experimentale ……...… 127
II.3.3.3. Proceduri experimentale……. 127
II.3.3.3.1. Pregatirea criosectiunilor de țesuturi cu leziuni aterosclerotice……. 128
II.3.3.3.2. Preluarea acidului folic-FITC/Texas Red de către macrofagele peritoneale ……..... 129
II.3.3.3. Preluarea acidului folic-FITC/Texas Red de monocite U937 129
II.3.3.4. Rezultate şi discuții……..... 130
II.3.3.4.1. Internalizarea specifică a acidului folic-FITC/Texas Red de către macrofagele activate…..…… 130
II.3.3.4.2. Preluarea acidului folic de către celulele asociate plăcii de aterom..... 133
II.3.3.4.3. Preluarea specifică a acidului folic-FITC/Texas Red de către linia de celule U937……..….. 135
II.3.3.5. Concluzie…… 137

II.4. Concluzii generale……...… 139

II.5. Bibliografie……..…… 143

II.6. Lista lucrărilor ştiințifice publicate şi comunicate…….. 161

CUVINTE CHEIE

Celule endoteliale,

„Raft”-uri lipidice,

Caveolina-1,

PTRF,

Receptorul acidului folic

Diabet,

Hiperlipidemia,

Ateroscleroza,

PARTEA I
STADIUL ACTUAL AL CUNOŞTINȚELOR PRIVIND MICRODOMENIILE MEMBRANARE

Modelul „mozaicului fluid” al structurării membranelor celulare (ca şi a endomembranelor) are la bază un bistrat lipidic fluid heterogen, asimetric, organizat bidimensional, la care se adaugă: proteine care îi conferă caracterul unui mozaic (proteinele plutesc pe, sau sunt scufundate într-o mare lipidică), citoscheletul asociat membranei (structura aflată pe fața internă a membranelor) şi glicocalixul (structura expusă pe fața externă a membranelor, alcătuită din lanțuri oligo-(poli-)zaharidice din compoziția glicolipidelor, glicoproteinelor şi proteoglicanilor din membrană).

În completarea modelului „mozaic fluid” sub aspect structural, dar şi functional au fost definite noțiunile de domenii şi/sau microdomenii membranare. Compoziția şi existența microdomeniilor (caveole, „raft”-uri lipidice, structuri cu înveliş de clatrină) au o dinamică ce răspunde nevoilor în continuă schimbare ale celulelor, nevoi impuse de activitățile biochimice interne ale celulei, sau de stimuli externi la care celulele trebuie să răspundă. Componentele membranelor fie ele lipide, proteine sau structuri glucidice au atât roluri structurale cât şi metabolice. Aceasta dualitate a rolurilor este valabilă atât pentru clasele componentelor biochimice ale membranelor, cât şi pentru entitățile moleculare (aceeaşi moleculă poate îndeplini atât funcții structurale cât şi metabolice).

Un progres semnificativ s-a facut în biologia celulară şi moleculară în 2009 când Pike şi colaboratorii săi au formulat câteva întrebări al căror răspuns este căutat şi în prezent. Pe scurt acestea se adresează următoarelor mecanisme: 1) Cum se modifică nivelul proteinelor membranare ca răspuns la stimulii proveniti din mediul înconjurător care afectează compoziția şi comportamentul „raft”-urilor lipidice?; 2) Care sunt funcțiile fiziologice ale „raft”-urilor lipidice?; 3) Cum se realizează fluxul continuu al lipidelor membranare în, şi dinspre membrana plasmatică către compartimentele interne; 4) Cum afectează acest flux formarea domeniului şi cum poate dieta sau tratamentul medicamentos să modifice compoziția lipidică alterând funcția domeniilor lipidice?

PARTEA II
CONTRIBUȚII ORIGINALE

Experimentele efectuate *in vitro* pe sistemele membranare model *black hole* nu explică în totalitate funcțiile complexe ale celulelor intacte. În acest context s-au realizat experimente *in vivo* având ca obiectiv înțelegerea patofiziologiei microdomeniilor membranare. Datele studiilor noastre au arătat că:

În diabetul zaharat insulino dependent, celulele endoteliale exprimă un număr crescut de caveole, expun o suprafață luminală mai mare şi un complex membranar intern biosintetic bine dezvoltat. Aceste schimbări se corelează cu creşterea activității ACE, a conținutului de colesterol şi a expresiei caveolinei-1 indicând un răspuns al CE la stresul indus de creşterea glicemiei şi a concentrațiilor lipidelor serice (Uyy et al., 2010).

Asocierea dietei hiperlipidemice cu diabetul zaharat de tip I accentuează efectele induse de diabet în țesutul pulmonar.

Creşterea concentrației colesterolului în membrana plasmatică indusă de diabet de tip I şi/sau dieta hiperlipidemică, indică o îmbogățire a membranei celulare cu „raft”-uri lipidice cu o compoziție biochimică modificată care afectează considerabil fluiditatea şi permeabilitatea membranei celulare (Uyy et al., 2010, Uyy et al., in press 2012).

În patogeneza diabetului zaharat insulino dependent, creşterea expresiei caveolinei-1, concentrației de colesterol şi intensificarea activității enzimatice a ACE poate duce la o inhibare a eNOS localizat pe fața internă a membranei, urmată de scăderea producției de NO, care conduce în final la apariția disfuncției celulelor endoteliale (Uyy et al., 2010).

Rezultatele obținute au un potential aplicativ prin țintirea simultană a moleculelor de pe suprafața celulelor endoteliale afectate de hiperglicemie şi hiperlipidemie (ACE, caveolina-1), mecanism care ar putea fi o strategie terapeutică suplimentară în diabetul zaharat de tip I (Uyy et al., 2010)

Modelele experimentale realizate prin administrarea unei diete hiperlipidemice pe hamsterii Sirieni Aurii şi şoarecii *knockout* la APO E, au demonstrat dezvoltarea leziunilor aterosclerotice şi instalarea patologiei însoțită de modificări importante la nivelul celulei endoteliale (Haraba, Uyy et al., 2011, 2011, Uyy et al., in press 2012).

Dieta hiperlipidemică induce modificarea expresiilor proteinelor membranare implicate în fisiunea veziculelor de transport cofracționate cu caveolina-1. Aceste rezultate susțin rapida dezasamblare a caveolelor ca răspuns al celulei endoteliale la

stresul hiperlipidemic şi redistribuirea caveolinei-1 în „raft”-uri lipidice non-caveolare de la nivelul plasmalemei sau în membranele intracelulare (scăderea expresiilor PTRF şi dinaminei şi creşterea expresiilor proteice a caveolinei-1 şi filaminei A) (Uyy et al., in press 2012).

Variația indusă de dietă hiperlipidemică în expresia proteinelor cofracționate cu caveolina-1 implicate în fisiunea veziculelor de transport (PTRF, dinamină, clatrină şi filamină A) poate fi o explicație indirectă a creşterii internalizării macromoleculelor prin endocitoza mediată de clatrină dependentă de dinamină în defavoarea celei prin caveole în condițiile patologice induse de ateroscleroză în microvasculatura pulmonară (Uyy et al., in press 2012).

Instalarea aterosclerozei a indus o amplificare a expresiei RAGE şi a receptorilor la folat cofracționați cu caveolina-1 din membrana endoteliului pulmonar prin activarea căii de semnalizare AKT. Aceste mecanisme mențin şi amplifică procesele inflamatorii în țesutul pulmonar (Haraba, Uyy et al., 2011, 2011).

Tratamentul cu statină scade semnificativ tendința de acumulare a receptorului la folat şi RAGE în fracțiile membranare izolate din endoteliul pulmonar şi atenuează procesul de activare al căii de semnalizare AKT şi implicit al inflamației asociate aterosclerozei.

Dezasamblarea caveolelor indusă de hiperlipidemie şi redistribuirea caveolinei-1 în „raft”-uri lipidice non-caveolare nu pare a influența expresia celor două proteine (RAGE şi FR) în fracțiile membranare îmbogățite în „raft”-uri lipidice caveolina-1 pozitive şi mai degrabă se coroborează cu creşterea expresiei caveolinei-1.

Ateroscleroza induce o creştere a expresiei HSP 70 şi o scădere a expresiei HSP 90 cofracționate cu caveolina-1 în fracțiile membranare izolate din țesut pulmonar (Uyy et al., in press 2012).

Tratamentul cu statină inversează semnificativ procesele induse de hiperlipidemie scăzând secreția în ser a HSP-urilor 60 şi 70 şi crescând secreția si cofracționarea lui HSP 90 cu caveolina-1 (Uyy et al., in press 2012).

Modificarea expresiilor HSP 70 şi HSP 90 cofracționate cu caveolina-1 în fracțiile membranare se corelează cu cea din serul hiperlipidemic al animalelor din lotul experimental, ceea ce ne conduce la ipoteza implicării *„raft”*-urilor lipidice-caveolina-1-pozitive în secreția acestora (Uyy et al., in press 2012).

Pentru că modelele experimentale utilizate prezintă similitudini cu patologia umană, datele obținute pot avea relevanță asupra modulării proceselor moleculare la pacienții cu diabet zaharat de tip I şi /sau ateroscleroză.

Prin analiza cantitativă (spectrofluorimetric) şi calitativă (microscopie de fluorescență) s-a evidențiat o creştere a preluării conjugaților acidului folic de către macrofagele peritoneale provenite de la hamsterii hiperlipidemici comparativ cu cele din hamsterii hrăniți cu o dietă standard sau deficitară în acid folic (Antohe, Puchianu et al. 2005).

Analiza histologică a confirmat preluarea prevalentă în plăcile aterosclerotice populate de macrofage, în comparație cu nivelul scăzut de fluorescență detectat în regiunile distale (Antohe, Puchianu et al. 2005).

Experimentele realizate pe macrofagele U937 în cultură în mediu hiperlipidemic au confirmat rezultatele obținute *in vivo* (Antohe, Puchianu et al. 2005).

Preluarea crescută a folatului în macrofagele U937 poate fi explicată prin creşterea expresiei receptorilor la folat (FR) de pe macrofagele activate. Această creştere a expresiei FR poate fi exploatată în terapii țintite ale compuşilor acidului folic cu diverse medicamente către leziunile aterosclerotice, bogate în macrofage activate (Antohe, Puchianu et al. 2005).

Conceptul microdomeniilor membranare în explicarea disfuncției celulei endoteliale în diferite patologii este un subiect de mare actualitate. În acest sens caracterizarea conținutului proteic al acestora şi valorificarea oportunităților terapeutice localizate şi sortate de microdomeniile membranare lipidice ar putea extinde arsenalul opțiunilor de tratament în bolile cardiopulmonare.

Bibliografie

Elena Uyy, Felicia Antohe, Luminita Ivan, Raluca Haraba, Dorel Lucian Radu, Maya Simionescu, Upregulation of caveolina-1 expression is associated with structural modifications of endothelial cells în diabetic lung, Microvascular Research, 79, 154-159, 2010.

Elena Uyy, Luminita Ivan, Raluca Boteanu, Viorel Suica and Felicia Antohe, Heat Shock Proteins and Membrane Caveolins Overexpression în Experimental Hyperlipidemia trimisa spre publicare la Biology of the cell (FI 4,898)

Felicia Antohe, Luminita Radulescu, Elena Puchianu, Michael D. Kennedy, Philip Low, Maya Simionescu - Increased uptake of folate conjugates by activated macrophages în experimental hyperlipemia, Cell Tissue Res., 320(2):277-285, 2005. (FI 2,991)

Pike L. J., The challenge of lipid „raft”s, Journal of Lipid Research, 2009, 50:S323-328

Raluca Haraba, Elena Uyy, Viorel I. Suica, Luminita Ivan, Felicia Antohe - Fluvastatin reduces the high mobility group box 1 protein expression în hyperlipidemia, International Journal of Cardiology, Jul 1;150(1):105-7, 2011, (FI 7,078)

Raluca Haraba, Viorel I. Suica, Elena Uyy, Luminita Ivan, Felicia Antohe, Hyperlipidemia stimulates the extracellular release of nuclear high mobility group box 1 protein, Cell Tissue Res. Dec; 346 (3) : 361-8. 2011 (FI 3,114)

Two researchers from the Nicolae Simionescu Institute of Biology and Cell Pathology won the L'Oréal-UNESCO Scholarship 2025

The researchers Teodora Barbălată and Màdálina Gheţu, from the Institute of Biology and Cell Pathology "Nicolae Simionescu" of the Romanian Academy, are winners of the L'Oréal-UNESCO Scholarship "For Women in Edition", 2024-2025, section "Skills of Life". The opening ceremony of the 15th edition of this private scholarship program, held in partnership with the Romanian National Commission for UNESCO, opened on Tuesday, December 2, 2025, at the French Institute in Bucharest.

Teodora Barbălată is a postdoctoral researcher in biology, within the Department of Lipidomics, Institute of Biology and Cellular Pathology "Nicolae Simionescu". Her project also proposes the identification of an improved treatment method for nonalcoholic fatty liver disease, a condition with increasing incidence, but which does not yet benefit from a specific treatment. The project is entitled siRNA inhibition of long non-coding RNAs and CRISPR/dCas9-induced overexpression of endogenous genes; a new therapeutic approach for treating non-alcoholic fatty liver disease.

Mădălina Gheţu is a PhD student and research assistant at the Department of Cellular and Tissue Engineering, Nicolae Simionescu Institute of Cell Biology and Pathology. Her project pursues the development of new therapeutic strategies usable in cardiac fibrosis for which, currently, there is no specific treatment. The title of his project is Innovative Antifibrotic Strategies: Evaluating Nanoformulated Natural Compounds in Human Cardiac Organoids. She also proposes to use nanoforms in which she will encapsulate natural compounds with antifibrotic potential and, furthermore, she will test them on miniature heart models (organoisi), an alternative to experimental animal models.

During the editions, the L'Oréal-UNESCO Scholarship "For Women of Steel" was awarded to the following researchers from the Institute of Biology and Cellular Pathology "Nicolae Simionescu" of the Academy of Rome: here. Maya Simionescu (2001), Elena Butoi (2011), Monica Țucurescu (2018) and Raluca Țuțuianu (2022). Precisely that acad. Maya Simionescu was distinguished in 2001 with the UNESCO Special Honor Award for Women in Science.

This year, L'Oréal Romania has awarded 10 scholarships, each worth 10,000 euros. This edition approximately 80 candidates applied for the program, the files being evaluated by a jury consisting of academics, university professors and doctors from the three research areas targeted, life sciences, computer science and computer science.

The L'Oréal-UNESCO national private scholarship program "For Women in Science" was launched in Romania in 2009.

For Women
in Science
unesco
FONDATION
L'ORÉAL

entru Femeile
din Științe
unesco
FONDATION
L'ORÉAL
În parteneriat cu
unesco
UEFISCDI

For Women
in Science
unesco
FONDATION
L'ORÉAL

TEODORA BARBĂLATĂ
MĂDĂLINA DIEȚU

11th December, 2025

Acad. Maya Simionescu ,

Doctor Honoris Causa of the University of Medicine, Pharmacy ,Sciences and Technology

from Targu Mures

Academician Maya Simionescu, President of the Biological Sciences Section of the Romanian Academy, a prominent figure in cell biology research in Romania and a researcher with a rich international scientific record, received on Thursday, 11th December, 2025, the title of Doctor Honoris Causa awarded by the "George Emil Palade" University of Medicine, Pharmacy, Sciences and Technology of Targu Mures.

Prof. Dr. Leonard Azamfirei, Rector of UMFST, emphasized that the university in Targu Mures owes its name to the initiative of Acad. Maya Simionescu, who collaborated closely with the famous professor George Emil Palade, Nobel Prize laureate: "Every year, on the occasion of University Days, we award the title of Doctor Honoris Causa to a personality who has distinguished himself in a special way at the global level, in terms of science, culture (...) and in a mandatory way these people must have done something over time, something consistent for the University.

This year, the decision of the University Senate was that Academician Maya Simionescu should receive this honorable distinction. The fact that this University of Medicine, Pharmacy, Sciences and Technology bears the name of the Romanian-born scientist, George Emil Palade, is due to him."

The laudation was delivered by Prof. Anca Sim, who highlighted the fact that Academician Maya Simionescu "is a remarkable and complex personality, an illustrious scientist, a true symbol of duty pushed on the path of perfection and perfection (....), ranked first in the top "Best Scientists – 200 personalities in the field of biology and biochemistry"".

In the second part of the ceremony, acad. Maya Simionescu gave the vote of thanks, ending with a warm plea for the development of scientific research and teamwork: "Research is one of the most beautiful adventures of the human spirit - an Everest of knowledge, a team adventure, without limits, without barriers; it is an infinite road, like Brancusi's Column, a road to knowledge. One of us reaches the top. The peak is the symbol of recognition. But the true joy lies in the common ascent, on the road to the heights, sprinkled with the sadness of failures, but also the joy of success. Research is the Everest of the human spirit, an adventure where I like to believe that the impossible does not exist."

ZILELE UMFST 2025
Z.I.G.E. PALADE TÂRGU MUREȘ
8-13 DECEMBRIE

UMFST 2025
DECERNAREA TITLULUI ONORIFIC DE DOCTOR HONORIS CAUSA
DECERNAREA DIPLOMEI DE ONOARE „DR. PETRE MUSCĂ”

Romanian Academy

"Nicolae Simionescu" Institute of Cellular Biology and Pathology

PhD THESIS

STUDY OF THE PLASTICITY OF FETAL STEM CELLS WITH THERAPEUTIC POTENTIAL

Scientific supervisor:

Acad. Maya Simionescu

PhD student:

Andrei Constantinescu

Bucharest, 2013

CONTENTS

I. INTRODUCTION

II. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Chapter 1. Stem cells and cellular therapy

1.1. Stem cells

1.1.a. Stem cells clasification

1.1.b. The role of stem cells

1.1.c. The importance of stem cells

1.2. Stem cells differetiation

1.1.a. Totipotent stem cells

1.1.b. Pluripotent stem cells

1.1.c. Hematopoietic stem cells

1.1.d. Mesenchymal stem cells

1.1.e. Oligopotent stem cells

1.1.f. Unipotent stem cells

1.1.g. Cells with induced pluripotency

Chapter 2. Stem cells sources

2.1. Embryonic stem cells

2.2. Fetal stem cells

2.3. Adult stem cells

Chapter 3. The use of stem cells

3.1. Stem cells in fundamental research

3.2. Stem cells in pharmacologic research

3.3. Therapeutic applications of stem cells

III. ORIGINAL CONTRIBUTION

Chapter 1. Assessment of the vascular recelluarization potential of fetal stem isolated from Wharton's jelly

1.1. Introduction

1.2. Objectives

1.3. Methodology and results

1.3.1. Isolation and characterization of Wharton's jelly stem cells

1.3.1.a. Isolation of stem cells

1.3.1.b. Immuonphenotyping of stem cells

1.3.2. Differentiation and characterization of Wharton's jelly stem cells
1.3.2.a. Endothelial differentiation of mesenchymal stem cells
1.3.2.b. Immunophenotyping of endothelial progenitor cells
1.3.3. Isolation and processing of umbilical cord arteries
1.3.3.a. Isolation of arteries
1.3.3.b. Decellularization of arteries
1.3.4. Evaluation of vascular recellularization potential
1.3.4.a. Obtaining cells-vascular tissue co-cultures
1.3.4.b. Histological analysis
1.3.4.c. Fluorescence microscopy analysis
1.3.4.d. Immunophenotype evaluation
1.4. Discussions and conclusions
Chapter 2. Characterization and evaluation of the therapeutic potential of amniotic fluid cells
2.1. Introduction
2.2. Objectives
2.3. Methodology and results
2.3.1. Characterization of amniotic fluid cells
2.3.1.a. Morphological characterization
2.3.1.b. Ultrastructural analysis
2.3.1.c. Mezenchymal cells immunophenotyping
2.3.1.d. Mezenchymal cells transcriptomic profile
2.3.2. Differentiation of amniotic fluid cells
2.3.2.a. Endothelial differentiation
2.3.2.b. Endothelial cells ultrastructural analysis
2.3.2.c. Endothelial cells immunophenotyping
2.3.3. Sorting of CD117 positive cells from the amniotic fluid
2.3.3.a. Flow cytometry cell sorting
2.3.3.b. CD117 positive cells morphological analysis
2.3.3.c. Immunophenotype analysis of sorted cells
2.4. Discussions and conclusions
IV. GENERAL CONCLUSIONS
V. PROSPECTS
VI. REFERENCES

KEYWORDS

Fetal stem cells

Mesenchymal stem cells

Wharton’s jelly

Amniotic fluid

Human fetal vascular tissue

Cellular differentiation

Endothelial progenitor cells

Vascular recellularization

Flow cytometry

Cell sorting

ABSTRACT

This thesis **aims** at studying the plasticity of mesenchymal stem cells from fetal sources and evaluating the therapeutic potential of fetal stem cells and their implications in regenerative medicine. Thus, we wanted to investigate the differentiation ability of mesenchymal cells isolated from Wharton's jelly by endothelial progenitor cells and to evaluate the cardiovascular tissue regeneration potential thereof. To this end we intend to establish an *in vitro* model based on human fetal vascular tissue from umbilical cord arteries, in order to investigate the recellularisation potential of endothelial progenitor cells differentiated from fetal mesenchymal stem cells.

Also, we wanted to investigate the plasticity of mesenchymal stem cells from amniotic fluid by means of a thorough analysis of their ability to differentiate into endothelial progenitor cells, so that the therapeutic potential is assessed. To this end we wanted to investigate both immunophenotypic and transcriptomic profile of amniotic fluid mesenchymal cells but also the ultrastructural details of endothelial cells differentiated from mesenchymal cells in the amniotic fluid.

The thesis is divided in two parts. The first part, **Current state of knowledge**, is organized in three chapters describing aspects of stem cells (Chapter 1 of the *Current study of knowledge*) and the hierarchy of stem cells and their role (Chapter 1.1 of the *Current study of knowledge*) and their ability to differentiate (Chapter 1.2 of the *Current study of knowledge*). A description follows, concerning the types of cells depending on the source they are derived from and an overview of the isolation methods (Chapter 2 of the *Current study of knowledge*), and the last chapter is detailed using stem cells both in fundamental research and in pharmacological research and regenerative medicine (Chapter 3 of the *Current study of knowledge*).

In the second part of the thesis, **Original contribution**, the studies were divided in two chapters. In order to evaluate the potential for vascular recellularisation fetal stem cells isolated from Wharton's jelly (Chapter 1 of the *Original contribution*) I watched the isolation, characterization and differentiation of mesenchymal cells from Wharton’s jelly towards an endothelial line and the establishment of an *in vitro* model based on human fetal vascular tissue starting from umbilical cord arteries. Thus, we wanted to investigate the recellularisation potential of endothelial progenitor cells at both histological and immunophenotypic level.

The **results** obtained show the ability of mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to differentiate towards endothelial progenitor cells with a real therapeutic potential in vascular regeneration. These cells could have a major impact in regenerative medicine due to their low immunogenicity and therapeutic potential.

In the study regarding the evaluation of the therapeutic potential of amniotic fluid cells (Chapter 2 of the *Original Contribution*), we aimed to achieve a complete characterization of these cells at an immunophenotypic, ultrastructural and molecular level. To this end we used flow cytometry to investigate surface markers, electron microscopy and real-time PCR technique (Section 2.3.1 of the *Original Contribution*). At the same time, we wanted to evaluate the potential of amniotic fluid cell differentiation by inducing the differentiation towards the endothelial cells (Chapter 2.3.2 of the *Original Contribution*). Also, I watched the determination of phenotype CD117 stem cells from amniotic fluid by positive sorting and immunophenotypic analysis of derived positive CD117 cell cultures (Chapter 2.3.3 of the *Original Contribution*).

The **results** show the ability of amniotic fluid cells to differentiate into mature endothelial cells in the presence of surface markers specific to these cells, but also in the presence of specific intracellular structures such as plasmalemmal vesicles and Weibel-Palade bodies. Moreover, we observed the immunophenotypical differences of CD117 positive cells in the heterogeneous cell population in the liquid, in order to establish relationships between positive CD117 and negative CD117 cells within the heterogeneous population.

To sum up, as regards the regenerative potential of cells isolated from Wharton's jelly, our results showed that decellularized human umbilical cord arteries can be used as an acellular matrix and they are a good experimental model *in vitro*. We have shown that EPCs differentiated from the Wharton's jelly MSCs can repopulate damaged/ decellularised vascular tissue outlined by endothelial phenotype expression of specific markers CD31+ / CD34+ / CD105+ / CD133+ at the level of recellularized arteries. The histology and flow cytometry data we obtained suggests that EPCs differentiated from MSCs of fetal origin have a high therapeutic potential through their ability of repopulating the damaged/decellularized blood vessels.

As regards cells isolated from amniotic fluid, we can conclude that these cells show an immunophenotype specific to mesenchymal stem cells, be means of expressing markers CD29 , CD90 and CD73 . Immunophenotype CD29+ / CD90+ / CD105+ / CD133+ / CD146+ of these cells suggests the presence of specific markers and other cell types, such as CD105 specific to endothelial cells and CD133 on the surface of hematopoietic stem cells and

endothelial progenitor cells. Despite the very high capacity of proliferating the cells in the amniotic fluid, their immunophenotype changes after 10 days in culture, thus becoming CD29+ /CD90-/CD105-/CD133-/CD146. At a molecular level, AFC sites show both mesenchymal stem cell markers such as ACAN, BGLAP, COL2A1 and PPARG, and embryonic stem cell-specific transcriptomic markers such as OCT4, REX1 or SOX2. One should note the presence of specific markers such as hematopoietic stem cells CD3D, CD4, CD8A or MME and neural stem cell-specific markers such as NCAM1, SIGMAR1 and S100B. These results lead us to the assumption that there is a limited number of specific markers at the level of stem cells. This phenomenon could be correlated with the differentiation potential, in response to external stimuli by the existence of “primer” molecules that lead the differentiation depending on the applied stimuli.

Also, AFCs show the capacity of differentiation towards the endothelial line. These cells can differentiate into cells with immunophenotype specific to mature endothelial cells, as shown by the flow cytometry technique, by the presence of endothelial markers CD31, CD105 and CD144. An important novelty is the ultrastructural analysis of AFC differentiated sites that showed the presence of intracellular structures specific to endothelial cells, such as plasmalemmal vesicles and the Weibel-Palade bodies. Thus, not only do these cells have the ability to be guided by endothelial line, but they may also become mature endothelial cells with the structures required for a possible fulfillment of their functions, such as, for example the plasmalemmal vesicles that may be involved in the processes of transcytosis.

As future **perspectives** we want to investigate the ability of amniotic fluid cells to repopulate damaged /decellularized blood vessels. In addition we aim a using the positive CD117 stem cells in a co-culture with endothelial progenitor cells isolated from cord blood, in order to investigate their regeneration effect, without the use of growth factors and the *in vitro* differentiation, in order to support a possible therapeutic strategy with clinical applicability.

ROMANIAN ACADEMY

School of Advanced Studies of the Romanian Academy

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"

PhD THESIS SUMMARY

IDENTIFICATION AND UTILIZATION OF FACTORS SECRETED BY MESENCHYMAL-DERIVED CELLS IN CUTANEOUS WOUND THERAPY: *IN VITRO* AND *IN VIVO* STUDIES

PhD SUPERVISOR:

Acad. Maya Simionescu

PhD STUDENT:

Daniela-Mădălina Iacomi (Gheţu)

Bucharest

2025

Keywords: chronic wounds, regenerative medicine, mesenchymal stromal cells, immortalization, fibroblasts, secretome, tridimensional culture, wound healing, re-epithelialization, angiogenesis

Total number of pages – 249

Number of figures in Part I – 15

Number of tables in Part I – 5

Number of figures in Part II – 99

Number of tables in Part II – 3

Number of bibliographic references – 338

Number of original papers published in ISI-indexed international journals – 4 (3 as main author, 1 as co-author)

Number of original papers in preparation – 2 (main author)

Book chapters – 1

Oral communications presented at international scientific events – 2

Posters presentations at national and international scientific events – 7 (3 as main author)

International stages completed during the doctoral programme – 1

Number of courses and seminars attended during the doctoral programme - 7

National awards received from UEFISCDI – 2

Registered national patents – 1 (submitted)

Scholarships obtained during the doctoral training programme and funding of the research activity – 2 (PhD scholarship from the Romanian Academy, scholarship from Romanian Ministry of Education for an international research stage)

Participation in national research grants – 4

Participation in international research grants – 2

CONTENT

ABBREVIATION LIST 9

INTRODUCTION AND GENERAL OBJECTIVES 14

I. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE 18

I.1. SKIN WOUNDS: ANATOMICAL AND PHYSIOLOGICAL BASIS AND MODERN THERAPEUTIC STRATEGIES 19

I.1.1. Anatomical Structure and Physiology of the Skin 19

I.1.1.1. Epidermis 20

I.1.1.2. Dermis 24

I.1.1.3. Hipodermis 27

I.1.1.4. Skin Appendages 27

I.1.2. Phases of Cutaneous Wound Healing 29

I.1.2.1. Hemostasis 30

I.1.2.2. Inflammation 31

I.1.2.3. Proliferation 32

I.1.2.4. Remodelling 33

I.1.3. Disruption of the Physiological Healing Process in Chronic Skin Wounds 34

I.1.4. Current Therapeutic Approaches for Chronic Skin Wounds 37

I.2. THE CONTRIBUTION OF THE MESENCHYMAL STROMAL CELL (MSC)-DERIVED SECRETOME TO SKIN WOUND HEALING 41

I.2.1. Characteristics of MSCs 41

I.2.2. Composition of the MSC-derived Secretome 43

I.2.2.1. Soluble Factors 44

I.2.2.2. Extravesicles 46

I.2.3. Methods for Enhancing Secretome Activity 48

I.2.3.1. Cell Culture under Hypoxic Conditions 49

I.2.3.2. Tridimensional (3D) Cell Culture 51

I.2.3.3. Cell Treatment with Various Inflammatory Molecules 54

I.2.4. Secretome of the MSC-Derived Secretome - a Potential Therapeutic Approach for Skin Wounds 55

I.3. THE USE OF FIBROBLASTS AS AN ALTERNATIVE TO MSCs 59

I.3.1. The Similarities Between Fibroblasts and MSCs 59

I.3.2. The Use of Secretome derived from Fibloblasts as Therapeutic Approches for Skin Wounds 60

I.3.2.1. *In vitro* Studies 60

I.3.2.2. *In vivo* Studies 67

I.4. APPROACHES FOR GENERATING AN UNLIMITED SOURCE OF MESENCHYMAL CELLS 69

I.4.1. Immortalization of Mesenchymal Cells 69

I.4.2. Derivation of Mesenchymal Stem Cells from Induced Pluripotent Stem Cells 77

II. ORIGINAL CONTRIBUTIONS 80

II.1. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HUMAN MSCs DERIVED FROM BONE MARROW AND ADIPOSE TISSUE, AS WELL AS HUMAN PRIMARY DERMAL FIBROBLASTS ISOLATED FROM THE DERMIS AND THOSE DERIVED FROM HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS 81

II.1.1. Introduction and Objectives 81

II.1.2. Materials and Methods 81

II.1.2.1. Isolation of Human MSCs from Bone Marrow 81

II.1.2.2. Isolation of Human MSCs from Adipose Tissue…. 82

II.1.2.3. Isolation of Primary Dermal Fibroblasts 83

II.1.2.4. Generation of Dermal Fibroblasts through Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells 84

II.1.2.5. Transmission Electron Microscopy (TEM) 85

II.1.2.6. Immunophenotypic Analysis by Flow Cytometry 86

II.1.2.7. Fluorescence Imaging 87

II.1.2.8. Analysis of Differentiation Potential towards Adipogenic, Osteogenic, and Chondrogenic Lineages 88

II.1.3. Results 88

II.1.3.1. Initiation of Pure Cultures of Human Primary MSCs Derived from Bone Marrow and Adipose Tissue, as Well as Human Primary Dermal Fibroblasts 88

II.1.3.2. Human Primary MSCs Derived from Bone Marrow and Adipose Tissue, as Well as Human Primary Dermal Fibroblasts, Express Specific Cell Surface Markers and Exhibit Differentiation Potential towards Adipogenic, Osteogenic, and Chondrogenic Lineages in Culture 92

II.1.3.3. Characterization of Dermal Fibroblasts Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cells 94

II.1.4. Discussions and Partial Conclusions 98

II.2. *IN VITRO* TESTING OF THE SECRETOME FROM AN IMMORTALIZED LINE OF ADIPOSE TISSUE-DERIVED MSCs (ADSCs) FOLLOWING ITS EFFECT ON THE PROCESSES INVOLVED IN SKIN WOUND HEALING..... 99

II.2.1. Introduction and Objectives..... .99

II.2.2. Materials and Methods 100

II.2.2.1. Cell culture 100

II.2.2.2. Experimental Design for Obtaining the Clonal Subpopulation of ADSC 101

II.2.2.3. Cell Proliferation Kinetics 102

II.2.2.4. Multilineage Differentiation Assays 102

II.2.2.5. Karyotyping of the Clonal Subpopulation of Immortalized Cells 103

II.2.2.6. Protein Expression Analysis by Western Blot 104

II.2.2.7. Production, Collection, and Storage of Secretome 104

II.2.2.8. Cell Viability Assay..... 104

II.2.2.9. Cell Proliferation Assay 105

II.2.2.10. Cell Migration Assessment Using the Monolayer Scratch Assay 105

II.2.2.11. Real-Time Assessment of Chemotaxis Using the xCELLigence System..... 105

II.2.2.12. Matrigel Angiogenesis Assay 106

II.2.2.13. Detection of Angiogenic Factors Using Angiogenesis Array Kit 106

II.2.2.14. Evaluation of Re-epithelialization Using an *In Vitro* Organotypic Culture Model 106

II.2.2.15. Hematoxylin-Eosin Staining..... 107

II.2.2.16. Statistical Analysis..... 107

II.2.3. Results 107

II.2.3.1. Characterization of the Clonal Subpopulation of Immortalized Adipose-Derived MSCs……..108

II.2.3.2. The Factors Released into the Conditioned Medium by the Clonal Subpopulation of hTERT-transduced ADSCs have a High Capacity to Support the Viability, Proliferation, and Migration of Keratinocytes and Dermal Fibroblasts 110

II.2.3.3. The Secretome derived from the hTERT-transduced Clonal Subpopulation of ADSCs has Pro-Angiogenic Properties.....114

II.2.3.4. The Secretome derived from the hTERT-transduced Clonal Subpopulation of ADSCs Promotes Re-Epithelialization of Wounds in An Organotypic Skin Culture Model 118

II.2.4. Discutions and Partial Conclusions 119

II.3. COMPARATIVE STUDY ON THE PROPERTIES OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS AND HUMAN BONE MARROW-DERIVED MSCs CULTIVATED IN TWO-DIMENSIONAL AND THREE-DIMENSIONAL SYSTEMS 123

II.3.1. Introduction and Objectives 123

II.3.2. Materials and Methods 124

II.3.2.1. Cells Used in the Study 124

II.3.2.2. Three-Dimensional Cell Culture Model 124

II.3.2.3. Hematoxylin-Eosin Staining 125

II.3.2.4. Immunofluorescence Detection of F-actin 125

II.3.2.5. Transmission Electron Microscopy (TEM) 126

II.3.2.6. Annexin-PI Staining 126

II.3.2.7. Immunophenotypic Analysis by Flow Cytometry 127

II.3.2.8. Analysis of Differentiation Potential into Adipogenic, Osteogenic, and Chondrogenic Lineages 128

II.3.2.9. Fluorescence Imaging 128

II.3.2.10. Protein Expression Analysis by Western Blot 129

II.3.2.11. Statistical Analysis 130

II.3.3. Results 130

II.3.3.1. Comparative Characterization of Primary Dermal Fibroblasts and Bone Marrow-Derived MSCs Cultivated in Three-Dimensional and Two-Dimensional Systems Regarding their Morphology and Maintenance of Defining Properties of MSCs 130

II.3.3.2. Primary Dermal Fibroblasts and Bone Marrow-derived MSCs Maintain Viability by Culturing in 3D Culture 141

II.3.3.3. Changes in Extracellular Matrix Secretion and Cell Adhesion Molecule Expression Induced by Three-Dimensional Cultivation of Primary Dermal Fibroblasts and Bone Marrow-Derived MSCs 143

II.3.3.4. Preservation of Specific Surface Markers After Three-Dimensional Cultivation of Dermal Fibroblasts Differentiated from Induced Pluripotent Stem Cells 151

II.3.4. Discutions and Partial Conclusions 153

II.4. *IN VITRO* TESTING OF THE SECRETOME DERIVED FROM HUMAN PRIMARY DERMAL FIBROBLASTS AND FIBROBLASTS DIFFERENTIATED FROM HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS CULTIVATED IN 2D AND 3D SYSTEMS REGARDING ITS EFFECTS ON PROCESSES INVOLVED IN CUTANEOUS WOUND HEALING.... 158

II.4.1. Introduction and Objectives.... 158

II.4.2. Materials and Methods.... 159

II.4.2.1. Cell Types Used in the Study.... 160

II.4.2.2. Production, Collection, and Storage of Secretome.... 159

II.4.2.3. Assessment of Cell Proliferation.... 161

II.4.2.4. Real-time Cell Proliferation Assay.... 161

II.4.2.5. Evaluation of Keratinocyte and Fibroblast Migration Using the Scratch Assay.... 162

II.4.2.6. Real-time assessment of chemotaxis using the xCELLigence system 162

II.4.2.7. Gene expression analysis by qRT-PCR.... 162

II.4.2.8. Western Blot Analysis.... 164

II.4.2.9. Evaluation of Microvascular Endothelial Cell Migration Using the Scratch Assay.... 164

II.4.2.10. Formation of Capilar-like Structures on Matrigel.... 165

II.4.2.11. Detection of Angiogenic Factors using an "Angiogenesis Array kit".....

.... 165

II.4.2.12. Cytokine Detection Using Array Kits.... 166

II.4.2.13. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).... 166

II.4.2.14. Assessment of Cell Viability.... 167

II.4.2.15. Wound Model Created on an Organotypic Skin Culture Model.....167

II.4.2.16. Wound Model Established on a Skin Equivalent Obtained from Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids.... 168

II.4.2.17. Whole Mount Staining.... 169

II.4.2.18. Statistical Analysis.... 170

II.4.3. Results.... 170

II.4.3.1. Effect of the Secretome on the Proliferation of Keratinocytes and Fibroblasts.... 170

II.4.3.2. Effect of the Secretome on Keratinocyte and Fibroblast Migration.. 172

II.4.3.3. Chemoattractive Effect of the Secretome on Keratinocytes and Fibroblast 174

II.4.3.4. Evaluation of the Ability of Fibroblasts to Synthesize Extracellular Matrix Components 176

II.4.3.5. Effect of the Secretome on Endothelial Cell Migration, Chemoattraction, and the Capacity to Form Tube-Like Structures on Matrigel.....180

II.4.3.6. Identification and Quantification of Pro-Angiogenic Factors Released in 2D Culture, Compared to 3D Culture 183

II.4.3.7. *In vitro* Functional Evaluation of the Anti-Inflammatory Properties of the Secretome Harvested from Fibroblast-Derived Spheroids..... 184

II.4.3.8. The Pro-Reparative Effect of the Secretome Demonstrated in an Organotypic Skin Culture Wound Model 189

II.4.3.9. Evaluation of the Effect of the Secretome from Fibroblasts Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cells on Wounds Created on Skin Equivalents Derived from Organoids 191

II.4.4. Discutions and Partial Conclusions 194

II.5. *IN VIVO* TESTING OF THE SECRETOMES FROM PRIMARY HUMAN DERMAL FIBROBLASTS CULTURED IN 2D AND 3D SYSTEMS REGARDING THEIR ACTION ON THE PROCESSES INVOLVED IN SKIN WOUND HEALING.....197

II.5.1. Introduction and objectives..... 197

II.5.2. Materials and methods 198

II.5.2.1. C57BL/6 Mouse Line 198

II.5.2.2. Production, Harvesting, and Storage of Secretome 198

II.5.2.3. Matrigel Plug Assay 198

II.5.2.4. Hematoxylin-Eosin Staining..... 200

II.5.2.5. Tricrom Masson-Goldner Staining 200

II.5.2.6. Fluorescence Imaging..... 200

II.5.2.7. Murine Excisional Wound Model 201

II.5.2.8. Wound Closure Assessment..... 202

II.5.2.9. Herovici Staining 202

II.5.2.10. Statistical Analysis..... 202

II.5.3. Results 203

II.5.3.1. *In Vivo* Demonstration of the Pro-Angiogenic Properties of the Secretome Collected from Fibroblast-Derived Spheroids 203

II.5.3.2. Optimization of the Animal Model for Cutaneous Wound, Preparation of Experimental Groups, and Selection of Analysis Time Points.....205

II.5.3.3. Demonstration of the Pro-Repair Effect of the Secretome from Three-Dimensional Cultured Fibroblasts by Quantifying Murine Excisional Wound Closure 207

II.5.3.4. Evaluation of the Pro-Repair Effect of the Secretome from Three-Dimensional Cultured Fibroblasts on Excisional Wounds through Histological and Immunohistochemical Analysis.....210

II.5.4. Discutions and partial conclusions 217

GENERAL CONCLUSIONS.....219

BIBLIOGRAPHY 220

INTRODUCTION AND GENERAL OBJECTIVES

Wound healing of cutaneous tissue is a physiological process, which involves a sequence of a several interconnected biological and molecular events in response to the occurrence of an injury, resulting in the reconstitution of the skin layers integrity and the restoration of homeostasis. During this dynamic and complex process, multiple biological pathways are activated and synchronized, with coordinated interactions between inflammatory cells, dermal fibroblasts, keratinocytes and endothelial cells (Paul & Sharma, 2004; Reinke & Sorg, 2012). At the same time, resident stem cells can undergo self-replication and differentiation into multiple cell types and can implicitly affect paracrine signaling at the wound level, all of which are crucial for tissue regeneration (Chen et al., 2009).

Depending on the duration of healing, skin wounds are classified into acute and chronic (healable and difficult to heal, respectively) (Robson et al., 2001). Acute wounds show well-defined signs of recovery within 4 to 12 weeks, the healing period depending on the extent of the injury. In some cases, it is impossible to effectively restore normal tissue structure and function, as the physiological wound healing process is interrupted, as a result of dysfunctions in the regulation of tissue repair responses, such as inflammation, angiogenesis, extracellular matrix deposition and cell recruitment. Thus, the inflammatory phase associated with excessive inflammation, the decreased of angiogenesis and the poor keratinocytes and fibroblasts (Fb) migration and proliferation are the key elements of chronic wounds (Falanga, 2005; Lazarus et al., 1994).

Currently, the incidence of chronic wounds continues to increase, representing a significant clinical challenge. Usually, adults with comorbidities such as venous insufficiency, diabetes, obesity, neuropathies, arterial insufficiency or presenting various limiting factors such as aging, infections, poor nutrition, immunosuppression, are affected. Chronic wounds are classified into three major categories: vascular ulcers, diabetic ulcers, and pressure ulcers (Nunan et al., 2014).

Despite the efforts made over time, chronic skin wounds and their healing represent major clinical challenges, which involve a considerable social and medical burden. However, there is significant interest in the use of stem cells in the management of this problem. In the last decades, regenerative medicine has gained considerable attention, based on the restoration, replacement or repair of traumatized cells, tissues and organs, thus offering possible treatment methods.

Mesenchymal stromal cells (MSCs) play an important role in this field. They are defined as a heterogeneous group of unspecialized spindle-shaped progenitor cells (Fb-like shape), of mesodermal origin, adherent to plastic under standard culture conditions and capable of self-renewal by division and differentiation into multiple cell lineages (Wei et al., 2013). These cells were first identified in bone marrow (BM). However, harvesting BM cells (BM aspirate) is an invasive and painful procedure, with a low yield of MSCs (Pittenger et al., 1999).

These limitations have driven the search for alternative sources of MSCs, including adipose tissue, Wharton's jelly, umbilical cord blood, placenta, amniotic fluid, and others (Keating, 2006; Ullah et al., 2015; Gottipamula et al., 2018; Eom et al., 2011). Among these, sources that enable minimally invasive harvesting and provide abundant cell yields, such as adipose tissue are preferable (Kuhbier et al., 2010).

Initially, the differentiation capacity of MSCs was studied as a potential regenerative therapy for the healing of cutaneous tissue wounds. It has been demonstrated that MSC transplantation promotes tissue repair primarily through paracrine effects rather than direct cell replacement. This paracrine effect is attributed to the secretome, which comprises soluble factors (such as cytokines and chemokines) and extracellular vesicles released by the cells into the extracellular space. Consequently, current research is focused on developing novel acellular therapeutic strategies that harness the MSC secretome to promote wound healing by stimulating

angiogenesis, modulating inflammation, reducing scar formation, and inducing re-epithelialization (Zarei & Soleimaninejad, 2018; Guillamat-Prats, 2021; Ahangar et al., 2020). Compared to cell-based therapy, the acellular therapy is less immunogenic and carries a minimal risk of tumor formation (Vizoso et al., 2017; Lu et al., 2017; Ha et al., 2020), at the same time offering advantages in terms of handling and safety.

Cells exhibit a limited number of population doublings *in vitro*, eventually leading to the onset of senescence and, consequently, cell death. To overcome this limitation, telomerase reactivation techniques are employed to preserve telomere length, enabling cells to undergo an unlimited number of divisions. Alternatively, methods based on inactivation of proteins involved in cell cycle regulation can be used. Cells obtained through these methods are genetically and phenotypically similar or identical to their original counterparts. This process, known as ‘‘cell immortalization’’ has been made possible by understanding the molecular mechanisms that drive this process *in vivo*, particularly in cancer (Ivanković et al., 2007; Chalak et al., 2024; de Bardet et al., 2023).

Fibroblasts (Fb) and MSCs share several common characteristics: spindle-shaped morphology, localization in connective tissue, proliferative potential, expression of specific surface markers, multipotency, lack of telomerase activity, and similar gene expression patterns. Furthermore, both cell types play analogous roles in immune regulation. Due to these similarities, Fb could serve as a promising alternative to MSCs for clinical applications, such as tissue regeneration and skin wound healing. They can be easily isolated in large quantities from various tissues, including skin, adipose tissue, and gingiva. In contrast, the most commonly used source of MSCs, bone marrow (BM), provides relatively limited material for expansion and requires invasive collection methods. Moreover, fibroblasts exhibit a significantly shorter population doubling time compared to MSCs, with senescence typically occurring after more than 50 population doublings (Huang et al., 2010). At the same time, the culture media requirements for expanding and maintaining Fb *in vitro* culture are not complex.

On the other hand, the regenerative potential of mesenchymal cells is influenced by various factors, such as the tissue of origin, the age of the donor, the culture conditions or the presence of inflammatory factors in the body (Ferreira et al., 2018). For this reason, several *in vitro* MSC preconditioning strategies, such as culturing under hypoxic conditions, in a 3D

system or treatment with inflammatory factors, have been used to stimulate their secretory properties (Haider and Ashraf, 2010; Lu et al., 2010). Moreover, fibroblasts cultured in the form of aggregates were assigned the concept of "nemosis" by Vaheri et al. (Vaheri et al., 2009). More specifically, this notion is defined as a way of activating cells, which is characterized by increased production of COX-2 (Cyclooxygenase-2), secretion of prostaglandins, proteinases, chemotactic cytokines, HGF (Hepatocyte Growth Factor), VEGF (Vascular endothelial growth factor) and expression of activated nuclear factor-kappa B (Vaheri et al., 2009; Enzerink et al., 2010). Thus, through this process, the paracrine properties of Fb can be improved, which can be the basis for therapeutic strategies that use the secretome ("cell-free" therapies).

Also, the generation of MSCs from stem cells seems to offer the unique opportunity to overcome most of the obstacles that currently exist regarding the large-scale use of MSCs as an innovative therapy. Over time, it has been reported that induced pluripotent stem cells (iPSCs) can be differentiated into MSCs, as well as Fb. They originate from a single clone of iPSCs, presenting high homogeneity for clinical applications. Moreover, their biological performance is more stable and predictable, as the molecular pattern of native MSC changes subtly between different batches.

Thus, **the aim** of this doctoral thesis was to evaluate the effects of the secretome derived from human mesenchymal cells on the wound healing process, both *in vitro* and *in vivo* on a murine wound model. To achieve this goal, several **objectives** have been proposed, utilizing numerous cell sources, all of human origin.

Objective 1. Obtaining and characterizing human mesenchymal stromal cells (MSCs) derived from bone marrow and adipose tissue, as well as primary human dermal fibroblasts or obtained from human induced pluripotent stem cells.

Objective 2. *In vitro* testing of the secretome from an immortalized line of adipose tissue-derived MSCs (ADSCs) following its effect on the processes involved in skin wound healing.

Objective 3. Comparative study of the properties of human dermal fibroblasts and human bone marrow-derived MSCs cultured in two- (2D) and three-dimensional (3D) systems.

Objective 4. *In vitro* testing of the effect of the secretome from primary dermal fibroblasts and fibroblasts derived from human induced pluripotent stem cells cultured in 2D and 3D systems on the processes involved in skin wound healing.

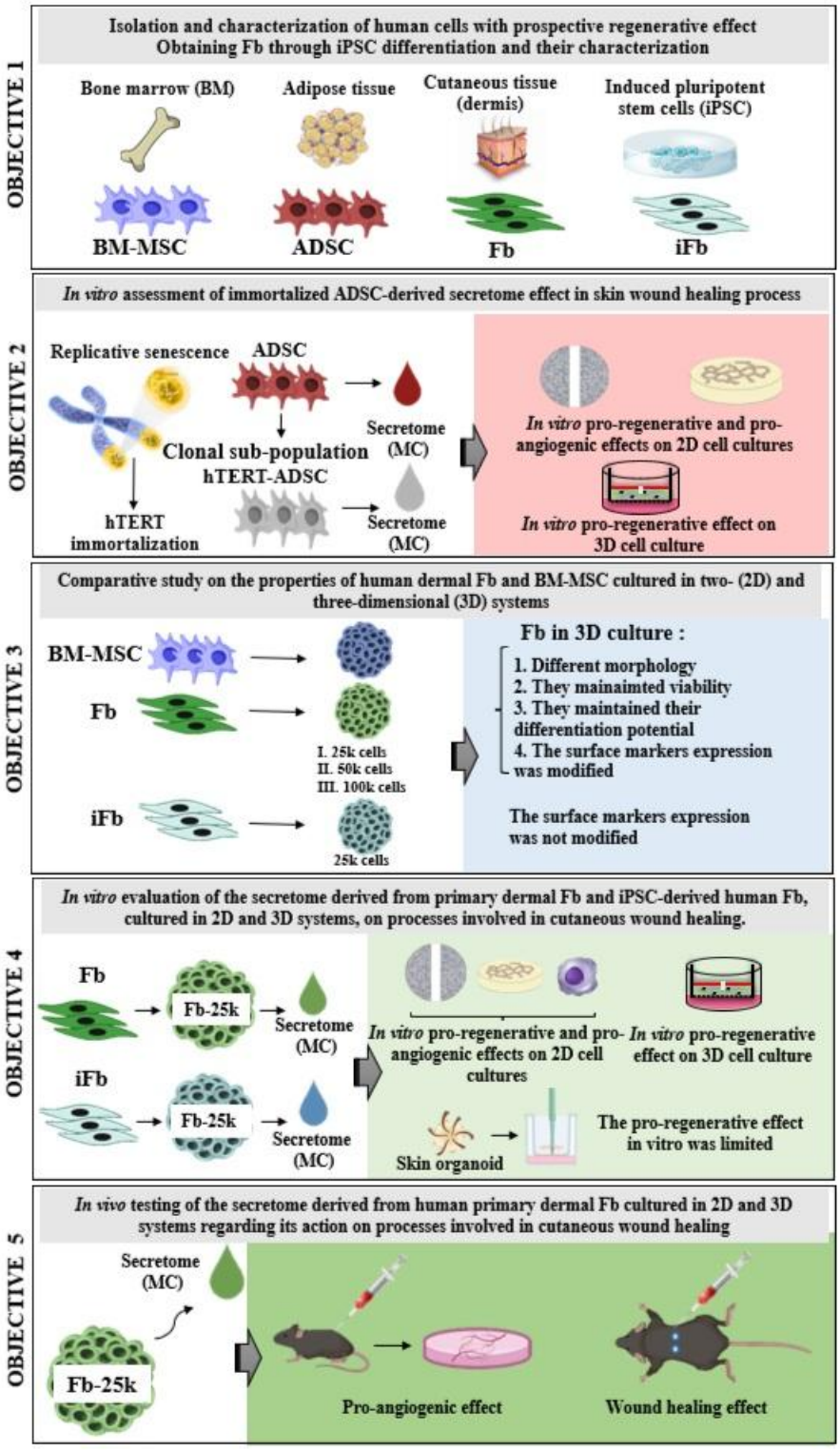
Objective 5. *In vivo* testing of the secretomes from primary human dermal fibroblasts cultured in 2D and 3D systems regarding their action on the processes involved in skin wound healing.

THESIS STRUCTURE

The thesis is structured in **9 chapters**, comprising theoretical notions regarding the current state of knowledge, as well as the original results obtained (the original contributions part).

The first section (“Current state of knowledge”) is structured in ***4 chapters*** and comprises up-to-date data from the literature regarding the subject of this thesis. More precisely, **chapter I.1** presents the issue of cutaneous wounds, focusing on the anatomical and physiological foundations of the cutaneous tissue, the stages of wound healing along with a brief presentation of the disruption of the physiological process encountered in the case of chronic cutaneous wounds, as well as current therapeutic approaches. **Chapter I.2** focuses on the defining characteristics of the contribution of the secretome originating from MSCs in the healing process of cutaneous wounds, focusing on the definition of MSCs, the description of the secretome composition secreted by these cells but also the presentation of current methods for boosting its activity. Also, studies in the literature suggesting the use of secretome from MSCs as a potential therapy for skin wounds are presented. **Chapter I.3** focuses on the concept of using fibroblasts as an alternative to MSCs, presenting the similarities between them, as well as existing studies on the applicability of the secretome from fibroblasts as a possible therapy for skin wounds. In **chapter I.4** are presented the potential directions for obtaining an inexhaustible source of mesenchymal cells: cell immortalization, as well as their generation from iPSCs. Some of the data presented in this section are part of a review article published this year in an ISI-indexed journal: **Gheţu, D-.M.**, Raymond, K., Titorencu, I., Simionescu, M. **2025.** Innovative Strategies: Use of Stromal Cell-Derived Secretome for Chronic Wound Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(12), 5609. DOI: 10.3390/ijms26125609 (IF/2024 = 4.9, Q1, AIS = 1.121).

The second section ("<u>The original contributions</u>") is structured into ***5 chapters*** based on the 5 objectives stated above. Thus, to achieve the proposed objectives we used various techniques such as cell cultures, flow cytometry, molecular biology, histology and animal experiments which are described in the ''Materials and Methods'' sections of each study. The content of the chapters is outlined in the figure below and briefly presented as follows.



The schematic representation of the content of the five chapters (objectives) in the second part of the thesis ("Original Contributions") is presented below. CM: conditioned medium. hTERT: telomerase reverse transcriptase (catalytic subunit of telomerase).

Chapter II.1 of the thesis is associated with the first objective (Objective 1), being entitled **"Obtaining and characterizing human mesenchymal stromal cells (MSCs) derived from bone marrow and adipose tissue, as well as primary human dermal fibroblasts or obtained from human induced pluripotent stem cells".** It presents the isolation of primary cells with regenerative potential for wound healing (MSCs derived from BM and adipose tissue and Fb isolated from dermis) and their characterization in terms of specific markers and the capacity to differentiate towards mesodermal cell lines: adipogenic, osteogenic and chondrogenic lines. Moreover, it is also focused on obtaining Fb by differentiating from iPSCs and characterizing them in terms of specific surface and intracellular markers (such as vimentin and collagen). The results show the success of isolating primary cells that express specific markers and have the ability to differentiate towards mesodermal cell lines. Fb were also obtained by differentiating iPSCs (iFb), expressing specific surface and intracellular markers. These cells were used in *in vitro* and *in vivo* experiments to achieve the other proposed objectives, which aim to use the secretome (conditioned medium) as an "acellular" therapy for skin wounds.

Chapter II.2 (Objective 2) is entitled **"*In vitro* testing of the secretome from an immortalized line of adipose tissue-derived MSCs (ADSCs) following its effect on the processes involved in skin wound healing**". It presents the generation of an immortalized line of ADSCs (clonal subpopulation) by lentiviral transduction of the gene encoding the reverse transcriptase (catalytic component) of human telomerase (hTERT) to overcome the phenomenon of replicative senescence and the *in vitro* evaluation of the effects of the secretome (conditioned medium) from these cells on key processes associated with skin wound healing. Briefly, the impact of the conditioned medium on the proliferation and migration of keratinocytes, Fb and endothelial cells, as well as on angiogenesis (processes that occur during the proliferative phase of wound healing), were reported. At the same time, the supporting effect on the re-epithelialization process of a wound made on an organotypic human skin culture model was also demonstrated. The results presented in this chapter were included in a paper published in an ISI indexed journal: **Iacomi, D. M.**, Roşca A. M., Ţuţuianu, R., Neagu, T. P., Prună, V., Simionescu, M., Titorencu, I. **2022**. Generation of an immortalized human adipose-derived mesenchymal stromal cell line suitable for wound healing therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16):8925. DOI: 10.3390/ijms23168925 (IF/2022 = 5.6, Q1, AIS = 1.028).

Chapter II.3 (Objective 3) entitled **"Comparative study on the properties of human dermal fibroblasts and human bone marrow-derived MSCs cultured in two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) systems**" involved the comparative analysis of primary human BM-MSCs and dermal Fb (as a much more accessible alternative cell source)/differentiated from iPSCs cultured in a 3D system (as a strategy to improve secretory capacity), more precisely in cell aggregates (spheroids) obtained by culturing cell suspension in „hanging drops". The spheroids/primary cells in their composition were analyzed in terms of morphology, viability, secretion of extracellular matrix components, presence of adhesion molecules, but also maintenance of specific surface markers and differentiation potential towards the adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages. The results showed that both primary cell types have the ability to aggregate into spheroids after 72 hours, detecting the secretion of extracellular matrix elements, the maintenance of differentiation potential, but also some morphological changes and the presence of specific surface markers. From the point of view of viability, no major changes were observed following the aggregation process. Fb differentiated from iPSCs also formed spheroids, maintaining their specific surface markers following aggregation. The original data contained in this study are part of a paper in preparation.

In **chapter II.4** (Objective 4) - **"*In vitro* testing of the effect of the secretome from primary dermal fibroblasts and from fibroblasts derived from human induced pluripotent stem cells cultured in 2D and 3D systems on the processes involved in skin wound healing**" - the results obtained regarding the *in vitro* evaluation of the effects of the conditioned medium from primary dermal Fb cultured in 3D systems (spheroids) on the key processes associated with skin wound healing: inflammation, angiogenesis and re-epithelialization, compared to the effects of the conditioned medium from Fb cultured in monolayer (2D) are presented. It was shown that the secretion of pro-angiogenic factors was increased by three-dimensional (3D) cultivation of primary human dermal Fb in the form of spheroids (25.000 cells/spheroid- 25k), improving the migration and proliferation processes, as well as re-epithelialization at the wound level on a 3D model of organotypic skin culture in the presence of the conditioned medium from these cells. Thus, the results obtained confirm that the secretome from these cells cultured in 3D system represents a possible treatment strategy for wound healing. At the same time, the data regarding the evaluation of the secretome obtained from iPSC-derived Fb (iFb) cultured in both

2D and 3D system (25000 cells/spheroid) are also presented, but no effect on stimulating the re-epithelialization on a 3D model of a skin equivalent obtained from organoids was obtained. The original data included in this study are part of a paper in preparation.

The last chapter of the original section, **chapter II.5** (objective 5) – "***In vivo* testing of the secretomes from primary human dermal fibroblasts cultured in 2D and 3D systems regarding their action on the processes involved in skin wound healing**" is associated with the *in vivo* evaluation of the effects of the conditioned medium from primary dermal Fb cultured in 3D systems (spheroids consisting of 25000 cells) in terms of angiogenesis and the re-epithelialization process, compared to the effects of the conditioned medium from Fb cultured in monolayer. In short, the results showed the beneficial effect of the secretome from primary human dermal Fb on angiogenesis and re-epithelialization of skin wounds, using the Matrigel plug assay technique and, respectively, a skin wound model on mice. The original data contained in this study are part of a paper in preparation.

Finally, the thesis concludes with the corresponding bibliography.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

LIST OF PUBLISHED AND COMMUNICATED PAPERS DURING THE DOCTORAL PROGRAMME

Papers published in ISI journals (first author)

1. **Gheţu, D.-.M**, Raymond, K., Titorencu, I., Simionescu, M. **2025.** Innovative Strategies: Use of Stromal Cell-Derived Secretome for Chronic Wound Therapy. *International Journal of Molecular Sciences, 26*(12), 5609. DOI: 10.3390/ijms26125609 (IF/2024 = 4.9, Q1, AIS = 1.121).

2. Sorca†, B. V., Kaya, D. A., Kaya, M. G. A., Enăchescu, M., **Gheţu†, D.-M.**, Enache, L.-B., Boeraşu, I., Coman, A. E., Rusu, L. C., Constantinescu, R., Titorencu, I. **2025**. Bone Fillers with Balance Between Biocompatibility and Antimicrobial Properties. *Biomimetics*, 10(2), 100. DOI: 10.3390/biomimetics10020100 (IF/2023 = 3.4, Q2, AIS = 0.567).

3. **Iacomi, D. M.**, Roşca A. M., Ţuţuianu, R., Neagu, T. P., Prună, V., Simionescu, M., Titorencu, I. **2022**. Generation of an immortalized human adipose-derived mesenchymal stromal cell line suitable for wound healing therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16):8925. DOI: 10.3390/ijms23168925 (IF/2022 = 5.6, Q1, AIS = 1.028).

Papers published in ISI journals (co-author)

1. Ţuţuianu, R., Roşca, A. M., **Iacomi, D. M.**, Simionescu, M., Titorencu, I. **2021**. Human mesenchymal stromal cell-derived exosomes promote *in vitro* wound healing by modulating the biological properties of skin keratinocytes and fibroblasts and stimulating angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6239. DOI: 10.3390/ijms22126239 (IF/2021 = 5.924, Q1, AIS = 1.064).

Collaborator in chapter published in an international monography

1. Roșca, A.M., Ţuţuianu, R., **Ghetu, D.M.**, Titorencu, I., **2023.** Mesenchymal stromal cells for wound healing therapy: From expectations to reality. In: K.H. Haider, ed. *Handbook of Stem Cell Applications*. Singapore: Springer. DOI: 10.1007/978-981-99-0846-2_53-1.

Papers in preparations

1. **Gheţu, D.-M.**, Ţuţuianu, R., Titorencu, I., Roşca, A.M. The secretome of human dermal fibroblasts spheroids supports skin regeneration by promoting the remodeling of the extracellular matrix on a full thickness wound mouse model.
2. **Gheţu, D.-M.,** Ramovs, V., Flesseman, M., Titorencu, I., Raymond, K., A Novel Full Thickness In Vitro Human Wound Model Based on Organoid-derived Skin Equivalent.

Presentations at international scientific manifestations

Oral presentations (2):

1. **Gheţu D.M.**, Roşca A.M., Ţuţuianu R., Neagu T.P., Prună V., Simionescu M., Titorencu I., Aggregates of dermal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells exhibit different characteristics: implications for regenerative therapy, "*International Conference and XXXIX Scientific Session of the Romanian Society of Cell Biology*", October 21-23, 2022, Cluj, Romania.

2. **Iacomi D. M.**, Roşca A.-M., Ţuţuianu R., Prună V., Titorencu I., Simionescu M., Generation and characterization of an immortalized human adipose mesenchymal stromal cell line, International Conference under the aegis of the Romanian Academy - 42nd Anniversary Symposium of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" held jointly with 38th annual scientific session of The Romanian Society for Cell Biology, November 4-6, 2021, online event.

Poster presentations (2):

1. **Gheţu D. M.,** Ţuţuianu R., Albu Kaya M. G., Roşca A. M., Titorencu I., Development of three-dimensional intestinal organotypic models using various collagen-based dermal equivalents", poster presented at the international conference "*Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering (NanoBioMat)*", June 25-27, 2025 (Summer Edition), online event.
2. **Gheţu D.M.,** Ţuţuianu R., Roşca A.M., Simionescu M., Titorencu I., Three-dimensional aggregation stimulates the pro-angiogenic properties of adult human dermal fibroblasts, poster presented at the anniversary symposium with international participation "*Aspiration, Inspiration, and Innovation in Exploring New Frontiers in Biomedical Research*" – organized on the occasion of the 45th anniversary of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", December 17-18, 2024, Bucharest, Romania.
3. **Gheţu D.M.**, Roşca A.M., Ţuţuianu R., Prună V., Simionescu M., Titorencu I., Human dermal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells display different characteristics when cultured in 3D settings, poster presented at the annual scientific symposium of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" with international participation "*43 years on the never-ending road of cardiovascular discoveries*", December 8-9, 2022, Bucharest, Romania.

Poster presentations at national and international scientific manifestations (co-author)

1. Ţuţuianu R., **Gheţu D.M.**, Titorencu I., Roşca A.M., Conditioned Medium Derived from Fibroblasts Cultured in Spheroids Promotes Skin Regeneration in a Murine Model of Cutaneous Wound", poster presented at the scientific event ARSAL Symposium 2024 "*Severity Assessment*

and the 3R Concept in Projects Using Animals in Experimentation'', March 29, 2024, organized by the Romanian Association for Laboratory Animal Science and hosted by the National Institute of Research and Development in Pathology and Biomedical Sciences "Victor Babeș'', Bucharest, Romania.

2. Prună V., **Gheţu D.M.**, Vrânceanu D., Cotruţ C., Vlădescu (Dragomir) A., Titorencu I., Enhanced osteogenic differentiation of human adult mesenchymal stem cells cultured on plate-like hydroxyapatite coatings, poster presented at the international conference, "*Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering (NanoBioMat)*", June 28-30, 2023 (Summer Edition) – online event.

3. Ţuţuianu R., Roşca A.M., **Gheţu D.M.**, Prună V., Albu Kaya M., Evaluation of mesenchymal cell-derived products as therapeutics for skin regeneration, poster presented at the scientific event "*1st NETSKINMODELS Network event*" February 14-18, 2023, Bratislava, Slovakia.

4. Rădulescu A. L., **Iacomi D.M.**, Florea G., Roşca A. M., Tutuianu R., Titorencu I., Obtaining and characterization of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, poster presented at the conference dedicated to International Microorganism Day (ZIM), September 17, 2021, Bucharest, Romania.

REGISTERED NATIONAL PATENTS

1. OSIM application no. A/00370 (25.06.2021): "Composite polymer hydrogels with antibacterial and wound-healing properties and method for their preparation''. Authors: Simionescu M., Roşca A.M., Titorencu I.D., **Iacomi M.D.**, Ţuţuianu R., Pruna V., Lasca I., Chercherita I.A., Neagu P.T., Mogoantă L., Mogosanu G.D., Pirici N.D., Streba C.T., Birca A.C., Burdusel A.C., Stoica A.E., Grumezescu A.L., Chircov C..

COURSES AND SEMINARS ATTENDED DURING THE DOCTORAL PROGRAMME

1. Training School ''3D Skin Cultures'' of the COST Action CA21108 – European Network for Skin Engineering and Modeling (NETSKINMODELS) – June 29 to July 2, 2025, Nijmegen, The Netherlands.

2. Prof. Dimitris Kardassis: Lectures to the students (Lipoprotein pathways and their roles in the pathophysiology of atherosclerosis; Transcriptional Regulation of Cardiovascular Genes: Basic principles and methodologies *in vitro* and *in vivo*; Hormone Nuclear receptors: from basic biology to clinical exploitation in CVD), November 14-18, 2024, Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu'', Bucharest, Romania.

3. Training course completed at the "Carol Davila'' University of Medicine and Pharmacy in Bucharest, entitled "Laboratory Animal Science'', held between January 30 and February 10, 2023.

4. INTERA-1 Summer School "Encapsulation of cells and drugs: materials, procedures and applications'', May 13-14, 2021, Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu'', Bucharest, Romania.

5. INTERA Online Workshop "Recent advances in the field of obtaining nanovectors for gene transfection'', April 22, 2021, Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu'', Bucharest, Romania.

6. THERAVALDIS Online Workshop "Diabetes in cardiovascular diseases; pathogenic mechanisms and targeted therapies'', November 27, 2020, Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu'', Bucharest, Romania.

7. DIABETER Online Workshop "A new therapeutic tool in autoimmune diabetes: Mesenchymal Stromal Cell'', November 20, 2020, Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu'', Bucharest, Bucharest, Romania.

INTERNATIONAL STAGES

1. International research stage abroad, lasting 9 months (September 2023 – May 2024), at Leiden University Medical Center, the Netherlands, and supported by a scholarship awarded by the Romanian Ministry of Education in accordance with Government Decision no. 118/2023.

AWARDS

1. Award offered by the Ministry of Education and Research and UEFISCDI ,,Scientific Achievements – Original Article'', PN IV, Program 5.2 - Human Resources – Subprogram 5.2.3 – Support – List 1 – First applications submitted for articles in 2021 and 2022_13.03.2023 for the article ''Generation of an immortalized human adipose-derived mesenchymal stromal cell line suitable for wound healing therapy'' published in the journal ,,International Journal of

Molecular Sciences'', Volume 23 (16), 8925, IF/2022 = 5.6 (**Iacomi, D. M.**, Roşca, A. M., Ţuţuianu, R., Neagu, T. P., Prună, V., Simionescu, M., Titorencu, I.).

2. Award offered by the Ministry of Education and Research and UEFISCDI ,,Scientific Achievements – Original Article'', Subprogram 1.1 - Human Resources - Awarding of Research Results - Articles, Competition 2021, Evaluation Results_List 2 - Award Applications Submitted for Articles Published in 2021_18.11.2021 – for the article ''Human mesenchymal stromal cell-derived exosomes promote *in vitro* wound healing by modulating the biological properties of skin keratinocytes and fibroblasts and stimulating angiogenesis" published in the journal ,,International Journal of Molecular Sciences'', Volume 22(12), 6239, 2021, IF/ 2021 = 5.924 (Ţuţuianu, R., Roşca, A. M., **Iacomi, D. M.**, Simionescu, M., Titorencu, I.).

SCHOLARSHIPS OBTAINED DURING THE DOCTORAL TRAINING PROGRAMME AND FUNDING OF THE RESEARCH ACTIVITY

SCHOLARSHIPS

1. Scholarship awarded by the Ministry of Education for a 9-month research stage abroad (September 2023 – June 2024) at Leiden University Medical Center, the Netherlands, in accordance with Government Decision no. 118/2023.
2. PhD scholarship – School of Advanced Studies of the Romanian Academy (2020–2023).

COLLABORATIONS IN RESEARCH GRANTS

Collaborator in the following national grants:

1. PN-IV-P7-7.1-PED-2024-1446

Proiect experimental demonstrativ

Title: *Innovative antimicrobial collagen based three dimensional scaffolds for craniofacial reconstruction*

Period: 2025-2027

Coordinator: Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu'', Bucharest

Project director: Dr. Irina Titorencu

Partner: LMS PLASTIC SURGERY CLINIQUE SRL – Dr. Ana Căruntu

2. **PN-III-P1-1.1-TE-2021-1344**

Research project for encouraging the establishment of young independent research teams

Title: *Enhancing the paracrine properties of fibroblasts by three-dimensional aggregation for chronic wounds therapy* - FIBROTHER

Period: 2022-2024

Project director: Dr. Roşca Ana-Maria

3. **PN-III-P2-2.1-PED-2021-4275**

Experimental Demonstration Project

Title: *Optimization of human mesenchymal stem cells interaction with innovative biomimetic structures for tissue engineering applications* - BioMimCells

Period: 2022-2024

Coordinator: University Politehnica of Bucharest

Project director: Dr. ing. Diana Maria Vrânceanu

Partners:

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", Bucharest - Partner Coordinator: Dr. Irina Titorencu

National Institute for Research and Development in Optoelectronics (INOE 2000), Bucharest - Partner Coordinator: Dr. Alina Vlădescu

4. **PN III PCCDI 45/2018**

Complex projects carried out in Research, Development and Innovation consortia

Title: *Bioactive Nanostructures for Innovative Therapeutic Strategies* - NANOLIFE

Period: 2018-2020

Coordinator: University of Medicine and Pharmacy of Craiova

Proiect director: Dr. Laurenţiu Mogoantă

Partners:

University of Medicine and Pharmacy "Carol Davila" Bucharest – Partner Coordinator: Dr. Ioan Lascăr

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", Bucharest – Partner Coordinator: Dr. Irina Titorencu

University Politehnica of Bucharest - Partner Coordinator: Dr. Alexandru Grumezescu

Collaborator in international grants:

1. PNRR–III-C9-2022-I8 CF 197/15.11.2022

***Romania's National Recovery and Resilience Plan*) - Project funded by the European Union**

Title: *Enchancing the endogenous anti-oxidant and cholesterol removal potential by gene editing in fatty liver disease; pre-clinical studies* - THERAGENLIV

Period: 2023-2026

Project director: Prof. Shlomo Sasson

2. European Cooperation in Science and Technology

***CA21108 - European Network for Skin Engineering and Modeling* (NETSKINMODELS)**

Period: 2022-2026

Project director: Prof. Sandrine Dubrac

REFERENCES

1. Ahangar, P., Mills, S.J. and Cowin, A.J., 2020. Mesenchymal stem cell secretome as an emerging cell-free alternative for improving wound repair. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(19), pp.7038.
2. Chalak, M., Hesaraki, M., Mirbahari, S.N., Yeganeh, M., Abdi, S., Rajabi, S. and Hemmatzadeh, F., 2024. Cell immortality: in vitro effective techniques to achieve and investigate its applications and challenges. *Life*, *14*(3), pp.417.
3. Chen, M., Przyborowski, M. and Berthiaume, F., 2009. Stem cells for skin tissue engineering and wound healing. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, *37*(4-5), pp.399-421.
4. de Bardet, J.C., Cardentey, C.R., González, B.L., Patrone, D., Mulet, I.L., Siniscalco, D. and Robinson-Agramonte, M.D.L.A., 2023. Cell immortalization: in vivo molecular bases and in vitro techniques for obtention. *BioTech*, *12*(1), pp.14.
5. Enzerink, A., Rantanen, V. & Vaheri, A. 2010. Fibroblast nemosis induces angiogenic responses of endothelial cells. *Exp Cell Res,* 316**,** pp.826-35.
6. Eom, Y.W., Lee, J.E., Yang, M.S., Jang, I.K., Kim, H.E., Lee, D.H., Kim, Y.J., Park, W.J., Kong, J.H., Shim, K.Y. and Lee, J.I., 2011. Rapid isolation of adipose tissue-derived stem cells by the storage of lipoaspirates. *Yonsei Medical Journal*, *52*(6), pp.999-1007.
7. Falanga, V., 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet*, *366*(9498), pp.1736-1743.

8. Ferreira, J.R., Teixeira, G.Q., Santos, S.G., Barbosa, M.A., Almeida-Porada, G. and Gonçalves, R.M., 2018. Mesenchymal stromal cell secretome: influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Frontiers in Immunology*, *9*, pp.2837.
9. Guillamat-Prats, R., 2021. The role of MSC in wound healing, scarring and regeneration. *Cells*, *10*(7), pp.1729.
10. Ha, D.H., Kim, H.K., Lee, J., Kwon, H.H., Park, G.H., Yang, S.H., Jung, J.Y., Choi, H., Lee, J.H., Sung, S. and Yi, Y.W., 2020. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration. *Cells*, *9*(5), pp.1157.
11. Haider, H.K. and Ashraf, M., 2010. Preconditioning and stem cell survival. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, *3*, pp.89-102.
12. Huang, H.I., Chen, S.K., Ling, Q.D., Chien, C.C., Liu, H.T. and Chan, S.H., 2010. Multilineage differentiation potential of fibroblast-like stromal cells derived from human skin. *Tissue Engineering Part A*, *16*(5), pp.1491-1501.
13. Ivanković, M., Ćukušić, A., Gotić, I., Škrobot, N., Matijašić, M., Polančec, D. and Rubelj, I., 2007. Telomerase activity in HeLa cervical carcinoma cell line proliferation. *Biogerontology*, *8*, pp.163-172.
14. Keating, A., 2006. Mesenchymal stromal cells. *Current opinion in hematology*, *13*(6), pp.419-425.
15. Kuhbier, J.W., Weyand, B., Radtke, C., Vogt, P.M., Kasper, C. and Reimers, K., 2010. Isolation, characterization, differentiation, and application of adipose-derived stem cells. *Bioreactor systems for tissue engineering II: strategies for the expansion and directed differentiation of stem cells*, pp.55-105.
16. Lazarus, G.S., Cooper, D.M., Knighton, D.R., Margolis, D.J., Percoraro, R.E., Rodeheaver, G. and Robson, M.C., 1994. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound Repair and Regeneration*, *2*(3), pp.165-170.
17. Lu, G., Haider, H., Porollo, A. & Ashraf, M. 2010. Mitochondria-specific transgenic overexpression of connexin-43 simulates preconditioning-induced cytoprotection of stem cells. *Cardiovasc Res,* 88**,** pp.277-86.
18. Lu, K., Li, H.Y., Yang, K., Wu, J.L., Cai, X.W., Zhou, Y. and Li, C.Q., 2017. Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy for intervertebral disc degeneration: in-vitro study on exosomes in interaction of nucleus pulposus cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, *8*, pp.1-11.
19. Nunan, R., Harding, K.G. and Martin, P., 2014. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Disease Models & Mechanisms*, *7*(11), pp.1205-1213.
20. Paul, W. and Sharma, C.P., 2004. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends Biomater Artif Organs*, *18*(1), pp.18-23.

21. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. and Marshak, D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. S*cience*, *284*(5411), pp.143-147.
22. Reinke, J.M. and Sorg, H., 2012. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, *49*(1), pp.35-43.
23. Robson, M.C., Steed, D.L. and Franz, M.G. 2001. Wound healing; biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Problems Surg*, *38*, pp.61-140.
24. Gottipamula, S., Bhat, S. and Seetharam, R.N., 2018. Mesenchymal Stromal Cells: Basics, Classification, and Clinical Applications. *Journal of Stem Cells*, *13*(1).
25. Ullah, I., Subbarao, R.B. and Rho, G.J., 2015. Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, *35*(2), pp.e00191.
26. Vaheri, A., Enzerink, A., Räsänen, K. and Salmenperä, P., 2009. Nemosis, a novel way of fibroblast activation, in inflammation and cancer. *Experimental Cell Research*, *315*(10), pp.1633-1638.
27. Vizoso, F.J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J. and Perez-Fernandez, R., 2017. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(9), pp.1852.
28. Wei, X., Yang, X., Han, Z.P., Qu, F.F., Shao, L. and Shi, Y.F., 2013. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, *34*(6), pp.747-754.
29. Zarei, F. and Soleimaninejad, M., 2018. Role of growth factors and biomaterials in wound healing. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *46*(sup1), pp.906-911.

The European Code of Conduct for Research Integrity

REVISED EDITION 2023

Published in Berlin by ALLEA | All European Academies
June 2023

Citation
For citation purposes, please use the following:

ALLEA (2023) The European Code of Conduct for Research Integrity – Revised Edition 2023. Berlin. DOI 10.26356/ECOC

ISBN 978-3-9823562-3-5

Licence
This work is licensed under the terms of the Creative Commons Attribution licence, which permits unrestricted use, provided the original author and source are cited (CC BY 4.0). The detailed licence terms are available at https://creativecommons.org/licenses/by/4.0.

Cover Picture: iStock
Layout: ALLEA Communications

Contact Information
ALLEA | All European Academies
Tel. +49 (0)30 20 60 66 500
Email: secretariat@allea.org
Twitter: @ALLEA_academies
Website: www.allea.org

Table of Contents

Preamble	3
1. Principles	5
2. Good Research Practices	6
3. Violations of Research Integrity	10
Annex 1: Key Resources	13
Annex 2: Revision Process	16
Annex 3: List of Stakeholders	17
Annex 4: ALLEA Permanent Working Group on Science and Ethics	18

Preamble

Research is the quest for knowledge obtained through systematic study, thinking, observation, and experimentation. While different disciplines may use different approaches, they each share the motivation to increase our understanding of ourselves and the world in which we live. Therefore, "The European Code of Conduct for Research Integrity" applies to research in all scientific and scholarly fields.

Research is a common enterprise, carried out by many different actors in academic, industry, and other settings. It involves collaboration, direct or indirect, which often transcends social, political, and cultural boundaries. It is underpinned by the freedom to define research questions and develop theories, gather empirical evidence, and employ appropriate methods in an impartial way. Therefore, research draws on the work of the community of researchers and should develop independently of pressure from commissioning parties and from ideological, economic, or political interests.

Research integrity is crucial to preserving the trustworthiness of the research system and its results. It encompasses the basic responsibility of the research community to formulate the principles of research, to define the criteria for proper research behaviour, to maximise the quality, reliability, and robustness of research and its results, and to respond adequately to threats to, or violations of, good research practices. Research results in this context include, but are not limited to, publications, data, metadata, protocols, code, software, images, artefacts, and other research materials and methods. The primary purpose of this European Code of Conduct is to help realise this responsibility and to serve the research community as a framework for self-regulation.

The research community encompasses a broad range of stakeholders including individual researchers, research teams, and research support staff. It also includes the institutions and organisations that enable research, such as research performing organisations, research funders, academies, learned societies, editors and publishers, and other relevant bodies. The European Code of Conduct describes professional, legal, societal, ethical, and moral responsibilities of the different actors in different settings, including those who define and implement the priorities and criteria for research funding, assessment, and publication. It acknowledges the role of institutions and organisations in facilitating good research practices through appropriate policies, processes, resources, and infrastructure.

Interpretation of the values and principles that regulate research may be affected by social, political, or technological developments and by changes in the research environment. Such changes since the 2017 edition of the European Code of Conduct include the development and application of technologies in research in new ways,

and the use and impact of social media to share and disseminate research results. The 2023 edition also takes account of changes in data management practices, the General Data Protection Regulation (GDPR), and recent developments in Open Science and research assessment. The 2023 edition of the European Code of Conduct also reflects a new awareness of the importance of research culture in enabling research integrity and implementing good research practices.

An effective European Code of Conduct for the research community promotes an ethical mindset. Its principles are relevant across the research system and in all disciplines and are applicable to publicly funded and private research. It can be the basis for local, national, and discipline-specific policies and guidelines, and applies to existing and new research practices such as citizen science or participatory research. Each stakeholder within the research community needs to take active responsibility for observing and promoting these practices and the principles that underpin them.

This document is an updated version of the 2017 edition of the European Code of Conduct for Research Integrity, developed by the European Federation of Academies of Sciences and Humanities (ALLEA). It is updated periodically to take account of evolving concerns and emerging areas so that it can continue to be fit for purpose in guiding the research community towards good research practice.

1. Principles

Good research practices are based on fundamental principles of research integrity. They guide individuals, institutions, and organisations in their work as well as in their engagement with the practical, ethical, and intellectual challenges inherent in research.

These principles include:

- ***Reliability*** in ensuring the quality of research, reflected in the design, methodology, analysis, and use of resources.

- ***Honesty*** in developing, undertaking, reviewing, reporting, and communicating research in a transparent, fair, full, and unbiased way.

- ***Respect*** for colleagues, research participants, research subjects, society, ecosystems, cultural heritage, and the environment.

- ***Accountability*** for the research from idea to publication, for its management and organisation, for training, supervision, and mentoring, and for its wider societal impacts.

2. Good Research Practices

This section describes good research practices in the following contexts:

- Research Environment
- Training, Supervision, and Mentoring
- Research Procedures
- Safeguards
- Data Practices and Management
- Collaborative Working
- Publication, Dissemination, and Authorship
- Reviewing and Assessment

2.1 Research Environment

• Research institutions and organisations promote awareness and resource incentives to ensure a culture of research integrity.

• Research institutions and organisations create an environment of mutual respect and promote values such as equity, diversity, and inclusion.

• Research institutions and organisations create an environment free from undue pressures on researchers that allows them to work independently and according to the principles of good research practice.

• Research institutions and organisations demonstrate leadership in clear policies and procedures on good research practice and the transparent and proper handling of suspected research misconduct and violations of research integrity.

• Research institutions and organisations actively support researchers who receive threats and protect bona fide whistle-blowers, taking into account that early career and short-term employed researchers may be particularly vulnerable.

• Research institutions and organisations support appropriate infrastructure for the generation, management, and protection of data and research materials in all their forms that are necessary for reproducibility, traceability, and accountability.

2.2 Training, Supervision, and Mentoring

• Research institutions and organisations ensure that researchers receive rigorous training in research design, methodology, analysis, dissemination, and communication.

• Research institutions and organisations develop appropriate and adequate training in ethics and research integrity to ensure that all concerned are made aware of the relevant codes and regulations and develop the necessary skills to apply these to their research.

• Senior researchers, research leaders, and supervisors mentor their team members, lead by example, and offer specific guidance and training to properly develop and structure their research activities.

• Researchers across the entire career path, from junior to the most senior level, undertake training in ethics and research integrity.

2.3 Research Procedures

• Researchers take into account the state-of-the-art in relevant fields when developing research ideas.

• Researchers design, carry out, analyse, and document research in a careful, transparent, and well-considered manner.

• Research protocols take account of, and are sensitive to, relevant differences among research participants, such as age, gender, sex, culture, religion, worldview, ethnicity, geographical location, and social class.

• Researchers make proper and conscientious use of research funds.

• Researchers share their results in an open, honest, transparent, and accurate manner, and respect confidentiality of data or findings when legitimately required to do so.

• Researchers report their results and methods, including the use of external services or AI and automated tools, in a way that is compatible with the accepted norms of the discipline and facilitates verification or replication, where applicable.

2.4 Safeguards

• Researchers, research institutions, and organisations comply with relevant codes, guidelines, and regulations.

• Researchers handle research participants and subjects (be they human, animal, cultural, biological, environmental, or physical) and related data with respect and care, and in accordance with legal provisions and ethical principles.

• Researchers have due regard for the health, safety, and welfare of the community, of collaborators, and others connected with their research.

• Researchers recognise and weigh potential harms and risks relating to their research and its applications and mitigate possible negative impacts.

• Researchers overseeing projects that cross professional boundaries, such as citizen science or participatory research, take responsibility for ensuring research integrity standards, oversight, training, and safeguards.

2.5 Data Practices and Management

• Researchers, research institutions, and organisations ensure appropriate stewardship, curation, and preservation of all data, metadata, protocols, code, software, and other research materials for a reasonable and clearly stated period.

• Researchers, research institutions, and organisations ensure that access to data is as open as possible, as closed as necessary, and where appropriate in line with the FAIR Principles (Findable, Accessible, Interoperable and Reusable) for data management.

• Researchers, research institutions, and organisations are transparent about how to access and gain permission to use data, metadata, protocols, code, software, and other research materials.

• Researchers inform research participants about how their data will be used, reused, accessed, stored, and deleted, in compliance with GDPR.

• Researchers, research institutions, and organisations acknowledge data, meta-data, protocols, code, software, and other research materials as legitimate and citable products of research.

• Researchers, research institutions, and organisations ensure that any contracts or agreements relating to research results include equitable and fair provisions for the management of their use, ownership, and protection under intellectual property rights.

2.6 Collaborative Working

• All partners in research collaborations take responsibility for the integrity of the research and its results.

• All partners in research collaborations formally agree at the outset, and monitor and adapt as necessary, the goals of the research and the process for communicating their research as transparently and openly as possible.

• All partners in research collaborations formally agree at the outset, and monitor and adapt as necessary, the expectations and standards concerning research integrity, the laws and regulations that will apply, protection of the intellectual property of collaborators, and procedures for handling conflicts and possible cases of misconduct.

• All partners in research collaborations are consulted and formally agree on submissions for publication of research results and other forms of dissemination or exploitation of the results.

2.7 Publication, Dissemination, and Authorship

• Authors formally agree on the sequence of authorship, acknowledging that authorship itself is based on: (1) a significant contribution to the design of the research, relevant data collection, its analysis, and/or interpretation; (2) drafting and/or critical reviewing the publication; (3) approval of the final publication; and (4) agreeing to be responsible for the content of the publication, unless specified otherwise in the publication.

• Authors include an 'Author Contribution Statement' in the final publication, where possible, to describe each author's responsibilities and contributions.

• Authors acknowledge important work and contributions of those who do not meet the criteria for authorship, including collaborators, assistants, and funders who have enabled the research.

• Authors disclose any financial and non-financial conflicts of interest as well as sources of support for the research or the publication.

• Authors and publishers promptly issue corrections or retract publications, if necessary, the retraction processes are clear and the reasons stated, and authors are given credit for issuing corrections post-publication.

• Authors, research institutions, publishers, funders, and the research community acknowledge that negative results can be as relevant as positive findings for publication and dissemination.

• Authors are accurate and honest in their communication to colleagues, policymakers, and society at large.

• Authors are transparent in their communication, outreach, and public engagement about assumptions and values influencing their research as well as the robustness of the evidence, including remaining uncertainties and knowledge gaps.

• Authors adhere to the same criteria as those detailed above whether they publish in a subscription journal, an open access journal, or in any other publication form, including preprint servers.

2.8 Reviewing and Assessment

• Researchers take seriously their commitment and responsibility to the research community through refereeing, reviewing, and assessment, and this work is recognised and rewarded by researchers, research institutions, and organisations.

• Researchers, research institutions, and organisations review and assess submissions for publication, funding, appointment, promotion, or reward in a transparent and justifiable manner, and disclose the use of AI and automated tools.

• Reviewers and editors declare any actual or perceived conflicts of interest and, when necessary, withdraw from involvement in discussion and decisions on publication, funding, appointment, promotion, or reward.

• Reviewers maintain confidentiality unless there is prior approval for disclosure.

• Reviewers and editors respect the rights of authors and applicants, and seek permission to make use of the ideas, data, or interpretations presented.

• Researchers, research institutions, and organisations adopt assessment practices that are based on principles of quality, knowledge advancement, and impact that go beyond quantitative indictors and take into account diversity, inclusiveness, openness, and collaboration where relevant.

3. Violations of Research Integrity

It is of crucial importance that researchers master the knowledge, methodologies, and ethical practices associated with their field. Failing to follow good research practices violates professional responsibilities. It damages the research processes, degrades relationships among researchers, undermines trust in and the credibility of research, wastes resources, and may expose research participants and subjects, users, society, or the environment to unnecessary harm.

3.1 Research Misconduct and other Unacceptable Practices

Research misconduct is traditionally defined as fabrication, falsification, or plagiarism (the so-called FFP categorisation) in proposing, performing, or reviewing research, or in reporting research results:

- ***Fabrication*** is making up data or results and recording them as if they were real.

- ***Falsification*** is manipulating research materials, equipment, images, or processes, or changing, omitting, or suppressing data or results without justification.

- ***Plagiarism*** is using other people's work or ideas without giving proper credit to the original source.

There are further violations of good research practice that distort the research record or damage the integrity of the research process or of researchers. In addition to violations of the good research practices set out in this European Code of Conduct, examples of other unacceptable practices include, but are not confined to:

- Allowing funders, sponsors, or others to jeopardise independence and impartiality in the research process or unbiased reporting of the results.

- Misusing seniority to encourage violations of research integrity or to advance one's own career.

- Delaying or inappropriately hampering the work of other researchers.

- Misusing statistics, for example to inappropriately suggest statistical significance.

- Hiding the use of AI or automated tools in the creation of content or drafting of publications.

- Withholding research data or results without justification.

- Chopping up research results with the specific aim of increasing the number of research publications ('salami publications').

- Citing selectively or inaccurately.

- Expanding unnecessarily the bibliography of a study to please editors, reviewers, or colleagues, or to manipulate bibliographic data.

- Manipulating authorship or denigrating the role of other researchers in publications.

- Re-publishing substantive parts of one's own earlier publications, including translations, without duly acknowledging or citing the original ('self-plagiarism').

- Establishing, supporting, or deliberately using journals, publishers, events, or services that undermine the quality of research ('predatory' journals or conferences and paper mills).

- Participating in cartels of reviewers and authors colluding to review each other's publications.

- Misrepresenting research achievements, data, involvement, or interests.

- Accusing a researcher of misconduct or other violations in a malicious way.

- Ignoring putative violations of research integrity by others or covering up inappropriate responses to misconduct or other violations by institutions.

In their most serious forms, unacceptable practices are sanctionable, but at the very least every effort must be made to prevent, discourage, and stop them through training, supervision, and mentoring and through the development of a positive and supportive research environment.

3.2 Dealing with Violations and Allegations of Misconduct

National and institutional guidelines differ as to how violations of good research practice and allegations of misconduct are handled. However, it is always in the interest of society and the research community that violations are handled in a fair, consistent, and transparent fashion. The following principles need to be incorporated into any investigation process:

- Anyone accused of research misconduct is presumed innocent until proven otherwise.

- Investigations are fair, comprehensive, and conducted expediently, without compromising accuracy, objectivity, or thoroughness.

- The parties involved in the investigation declare any conflict of interest that may arise during the investigation.

- Measures are taken to ensure that investigations are carried through to a conclusion.

- Investigations are conducted confidentially in order to protect those involved.

- Institutions protect the rights of bona fide whistle-blowers during investigations and ensure that their career prospects are not endangered.

- General procedures for dealing with violations of good research practice are publicly available and accessible to ensure their transparency and uniformity.

- Persons accused of research misconduct are given full details of the allegation(s) and are allowed a fair process for responding to allegations and presenting evidence.

- Investigations into research misconduct consider the role of both individuals and institutions contributing to the breach of good research practice.

• Action is taken against persons for whom an allegation of misconduct is upheld, which is proportionate to the severity of the violation.

• Appropriate restorative action is taken when researchers are exonerated of an allegation of misconduct.

Annex 1: Key Resources

All European Academies (ALLEA) (2013). "Ethics Education in Science: Statement by the ALLEA Permanent Working Group on Science and Ethics." www.allea.org/wp-content/uploads/2015/07/Statement_Ethics_Edu_web_final_2013_10_10.pdf [Accessed 26/04/2023]

All European Academies (ALLEA) (2018). "Ethical Aspects of Open Access: A Windy Road." https://www.allea.org/wp-content/uploads/2018/12/Ethical-Aspects-of-Open-Access-Report.pdf [Accessed 26/04/2023]

AllTrials (2013). http://www.alltrials.net/ [Accessed 26/04/2023]

American Association for the Advancement of Science (AAAS) (2017). "Ethics & Principles for Science & Society Policy-Making: The Brussels Declaration." http://www.sci-com.eu/main/docs/Brussels-Declaration.pdf [Accessed 26/04/2023]

American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting (2013). "San Francisco Declaration on Research Assessment." https://sfdora.org/read/ [Accessed 26/04/2023]

Committee on Publication Ethics (COPE). Guidelines. http://publicationethics.org/resources/guidelines [Accessed 26/04/2023]

Directory of Open Access Journals (DOAJ). https://doaj.org/ [Accessed 26/04/2023]

Embassy of Good Science. https://embassy.science/wiki/Main_Page [Accessed 26/04/2023]

EQUATOR Network. Reporting guidelines to enhance the quality and transparency of health research. https://www.equator-network.org/ [Accessed 26/04/2023]

EURODAT Collaborative Data Infrastructure. https://eudat.eu/data-management [Accessed 26/04/2023]

European Citizen Science Association (ECSA). Guidelines and Policies. https://www.ecsa.ngo/documents/ [Accessed 26/04/2023]

European Commission, Directorate-General for Research and Innovation (2020). "Six Recommendations for Implementation of FAIR Practice." https://data.europa.eu/doi/10.2777/986252 [Accessed 26/04/2023]

European Commission, Directorate-General for Research and Innovation (2020). "Access to and Preservation of Scientific Information in Europe." https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/6e5718ef-f179-11ea-991b-01aa75ed71a1 [Accessed 26/04/2023]

European University Association, Science Europe, European Commission – Directorate-General for Research and Innovation (2022). "Agreement on Reforming Research Assessment." https://coara.eu/agreement/the-agreement-full-text/ [Accessed 26/04/2023]

FORCE11, Data Citation Synthesis Group, Martone M. (ed.) (2014). "Joint Declaration of Data Citation Principles." https://doi.org/10.25490/a97f-egyk [Accessed 26/04/2023]

Hicks D., Wouters, P., Waltman L., et al. (2015). "Bibliometrics: The Leiden Manifesto for Research Metrics." Nature 520, 429-431. https://doi.org/10.1038/520429a [Accessed 26/04/2023]

InterAcademy Partnership (IAP) (2016). "Doing Global Science: A Guide to Responsible Conduct in the Global Research Enterprise." http://interacademycouncil.net/24026/29429.aspx [Accessed 26/04/2023]

InterAcademy Partnership (IAP) (2022). "Combatting Predatory Academic Journals and Conferences." https://www.interacademies.org/publication/predatory-practices-report-English [Accessed 26/04/2023]

International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). "Defining the Role of Authors and Contributors." http://www.icmje.org/recommendations/browse/roles-and-responsibilities/defining-the-role-of-authors-and-contributors.html [Accessed 26/04/2023]

Ministerial Conference on the European Research Area (2020). "Bonn Declaration on Freedom of Scientific Research." https://www.bmbf.de/bmbf/shareddocs/downloads/files/_drp-efr-bonner_erklaerung_en_with-signatures_maerz_2021.pdf [Accessed 26/04/2023]

Moher D., Bouter, L., Kleinert, S., Glasziou, P., Sham, M.H., Barbour, V., et al. (2020). "The Hong Kong Principles for Assessing Researchers: Fostering Research Integrity." PLoS Biology e3000737. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000737 [Accessed 26/04/2023]

National Information Standards Organization (2022). CRediT (Contributor Roles Taxonomy). https://credit.niso.org/ [Accessed 26/04/2023]

Open Access Scholarly Publishing Association (OASPA) (2022). "Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing." https://oaspa.org/principles-of-transparency-and-best-practice-in-scholarly-publishing-4/ [Accessed 26/04/2023]

Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) Global Science Forum (2007). "Best Practices for Ensuring Scientific Integrity and Preventing Misconduct." https://www.oecd.org/sti/sci-tech/40188303.pdf [Accessed 26/04/2023]

Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) Global Science Forum (2022). "Integrity and Security in the Global Research Ecosystem." https://read.oecd.org/10.1787/1c416f43-en [Accessed 26/04/2023].

Research Data Alliance RDA (2016). "RDA/WDS Publishing Data Workflows WG Recommendations." http://doi.org/10.15497/RDA00004 [Accessed 26/04/2023]

Research Data Alliance RDA (2016). “Data Description Registry Interoperability WG: Interlinking Method and Specification of Cross-Platform Discovery.” http://doi.org/10.15497/RDA00003 [Accessed 26/04/2023]

Standard Operating Procedures for Research Integrity (SOPs4RI). https://sops4ri.eu/ [Accessed 26/04/2023]

Trusted Secure Data Sharing Space (TRUST) project consortium (2018). “Global Code of Conduct for Research in Resource-Poor Settings.” https://www.globalcodeofconduct.org/ [Accessed 26/04/2023]

UK Academy of Medical Sciences (2016). “Perspectives on ‘Conflicts of Interest’.” https://acmedsci.ac.uk/file-download/41514-572ca1ddd6cca.pdf [Accessed 26/04/2023]

UNESCO (2021). “Recommendation on Open Science.” https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000379949.locale=en [Accessed 26/04/2023]

Vrije Universiteit Amsterdam Research Portal, Krishma Labib (2023). “Developing Guidelines for Research Institutions - Journey towards Research Integrity.” https://research.vu.nl/en/publications/developing-guidelines-for-research-institutions-journey-towards-r [Accessed 26/04/2023]

Wilkinson, M.D., Dumontier, M., Aalbersberg, IJ.J. et al. (2016). „The FAIR Guiding Principles for Scientific Data Management and Stewardship.” Scientific Data 3:160018. http://doi.org/10.1038/sdata.2016.18 [Accessed 26/04/2023]

World Conference on Research Integrity (WCRI) (2010). “Singapore Statement on Research Integrity.” https://wcrif.org/guidance/singapore-statement [Accessed 26/04/2023]

World Conference on Research Integrity (WCRI) (2013). “Montreal Statement on Research Integrity in Cross-Boundary Research Collaborations.” https://wcrif.org/guidance/montreal-statement [Accessed 26/04/2023]

World Conference on Research Integrity (WCRI) (2023). “Cape Town Statement on Fostering Research Integrity through Fairness and Equity.” https://www.wcrif.org/guidance/cape-town-statement [Accessed 26/04/2023]

Annex 2: Revision Process

The original European Code of Conduct for Research Integrity was developed in 2011 by the European Federation of Academies of Sciences and Humanities (ALLEA) and the European Science Foundation (ESF). From the start, the European Code of Conduct has been conceived as a living document that will be reviewed and revised as necessary to take account of evolving concerns and emerging areas, so that it can continue to serve the research community as a framework for good research practices.

A new version of the European Code of Conduct for Research Integrity was developed in 2017 by ALLEA. This revision was motivated by developments in, among others, the European research funding and regulatory landscapes, institutional responsibilities, communication and dissemination, the use of social media, review procedures, open access publishing, the use of repositories, and citizen involvement in research. The revision included extensive consultation among major stakeholders in European research, both public and private, to ensure a sense of shared ownership.

The present document is a revision of the 2017 European Code of Conduct for Research Integrity. This edition contains revisions to ensure that the European Code of Conduct remains fit for purpose and relevant to all disciplines and emerging areas of research or research practices. It takes account of changes in data management practices, the General Data Protection Regulation (GDPR), and recent developments in Open Science and research assessment. The changes reflect a new awareness of the importance of research culture in enabling research integrity and implementing good research practices. They also reflect greater awareness in the research community of mechanisms of discrimination and exclusion and the responsibility of all actors to promote equity, diversity, and inclusion.

Annex 3: List of Stakeholders

ALLEA would like to thank all stakeholder organisations and projects who generously provided detailed and insightful written feedback during the consultation process:

- Association of Learned and Professional Society Publishers (ALPSP)
- Committee on Publication Ethics (COPE)
- Conference of European Schools for Advanced Engineering Education and Research (CESAER)
- EU-LIFE
- European Association of Research and Technology Organisations (EARTO)
- European Association of Research Managers and Administrators (EARMA)
- European Chemical Society (EuChemS)
- European Commission
- European Group on Ethics in Science and New Technologies (EGE)
- European Industrial Research Management Association (EIRMA)
- European Molecular Biology Organization (EMBO)
- European Network of Research Ethics Committees (EUREC)
- European Network of Research Integrity Offices (ENRIO)
- European Physical Society (EPS)
- European University Association (EUA)
- EuroScience
- FoodDrinkEurope
- Global Young Academy (GYA)
- HYBRIDA
- International Association of Scientific, Technical and Medical Publishers (STM)
- League of European Research Universities (LERU)
- Open Access Scholarly Publishers Association (OASPA)
- Path2Integrity
- PRO-Ethics
- Responsible Open Science in Europe (ROSiE)
- Science Europe
- Standard Operating Procedures for Research Integrity (SOPs4RI)
- TechEthos
- The Guild
- UK Publishers Association
- Young European Research Universities Network (YERUN)

A detailed summary of the stakeholder feedback process and how this informed the 2023 revision can be found at https://allea.org/code-of-conduct/.

Annex 4: ALLEA Permanent Working Group on Science and Ethics

The ALLEA Permanent Working Group on Science and Ethics (PWGSE) is concerned with a wide range of 'internal' (within the research community) and 'external' (relations between science and society) issues. Since ethical considerations have been an essential component in the consolidation of a united Europe, and also in the creation of ALLEA, the PWGSE was established to bring together experts from academies across Europe and provide them with a platform for continuous debate on research ethics and research integrity.

The PWGSE has been extending its capacities and activities during recent years, in order to adequately fulfil its mission of collective deliberation on topics such as research integrity, ethics education in science and research training, ethics of scientific policy advice, trust in science, scientific misconduct, and plagiarism, among others.

Further topics recently addressed include ethical issues of open access publishing, reforming research assessment, and research on digital and (bio)medical technologies. Additionally, the group provides expertise for Horizon 2020 Science with and for Society (SwafS) and Horizon Europe WIDERA projects concerned with research ethics and integrity, and supports ALLEA membership of the TechEthos project, which addresses the ethics of new and emerging technologies with high socio-economic impact.

The PWGSE meets regularly and has also convened thematic meetings in wider settings, typically in partnerships with other relevant transnational organisations. The members of the PWGSE drew on their extensive network of experts and institutions for the successful execution of the revision process of "The European Code of Conduct for Research Integrity".

Members of the ALLEA Permanent Working Group on Science and Ethics

Maura Hiney (Chair) – Royal Irish Academy, ***Drafting Group***

László Fésüs – Hungarian Academy of Sciences

Göran Hermerén – Royal Swedish Academy of Letters, History and Antiquities, ***Drafting Group***

Lisa Maria Herzog – Global Young Academy, ***Drafting Group***

Anne Ruth Mackor – Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences

Anne Sophie Meincke – Austrian Academy of Sciences

Bertil Emrah Oder – Bilim Akademisi (The Science Academy, Turkey)

Deborah Oughton – Norwegian Academy of Science and Letters, ***Drafting Group***

Roger Pfister – Swiss Academies of Arts and Sciences

Pere Puigdomènech – Royal Academy of Sciences and Arts of Barcelona, Institute for Catalan Studies (Spain)

Michael Quante – Union of German Academies of Sciences and Humanities

Nils-Eric Sahlin – Royal Swedish Academy of Letters, History and Antiquities

Camilla Serck-Hanssen – Norwegian Academy of Science and Letters

Raivo Uibo – Estonian Academy of Sciences

Els Van Damme – Royal Academy of Sciences, Letters and Arts of Belgium, ***Drafting Group***

Krista Varantola – Council of Finnish Academies, ***Drafting Group (Chair)***

Support to the PWGSE and Drafting Group: Mathijs Vleugel (ALLEA Secretariat)

More information about the ALLEA Permanent Working Group on Science and Ethics can be found at https://allea.org/research-integrity-and-research-ethics/.

ALLEA – All European Academies

ALLEA, the European Federation of Academies of Sciences and Humanities, represents more than 50 academies from nearly 40 EU and non-EU countries. Since its foundation in 1994, ALLEA speaks on behalf of its members on European and international stages, promotes science as a global public good, and facilitates scientific collaboration across borders and disciplines.

Academies are self-governing bodies of distinguished scientists drawn from all fields of scholarly inquiry. They contain a unique human resource of intellectual excellence, experience, and multidisciplinary knowledge dedicated to the advancement of science and scholarship in Europe and the world.

Jointly with its members, ALLEA seeks to improve the conditions for research, to provide the best independent and interdisciplinary science advice available, and to strengthen the role of science in society. In doing so, ALLEA channels the expertise of European academies for the benefit of the research community, decision-makers, and the public. Outputs include science-based advice in response to topics that are critical to society as well as activities to encourage scientific cooperation, reasoning, and values through public engagement.

ALLEA is a not-for-profit association and remains fully independent from political, religious, commercial, or ideological interests.

allea | All European Academies

allea | All European Academies

ISBN 978-3-9823562-3-5

Raport iunie 2017-noiembrie 2017

Aceasta etapa a furnizat protocoale pentru izolarea si caracterizarea celulelor cardiace (cardiomiocite, celule endoteliale si fibroblasti) si analiza ecocardiografica la soareci de diferite varste (3- 20 luni), care arata o scadere a fractiei de ejectie si o scadere a scurtarii cardiace, datorate in principal unei cresteri a volumului la finalul sistolei.

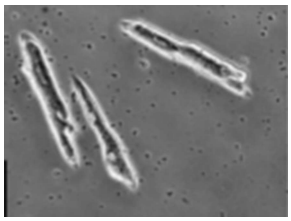


Figura 1. Aspectul CMC adulte in cultura, prin microscopie in contrast de faza. Se observa aspectul lor elongat, in forma de bete.

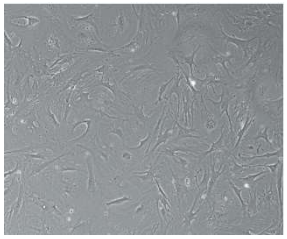


Figura 2. Aspectul fibroblastilor cardiaci adulti in cultura, prin microscopie in contrast de faza.

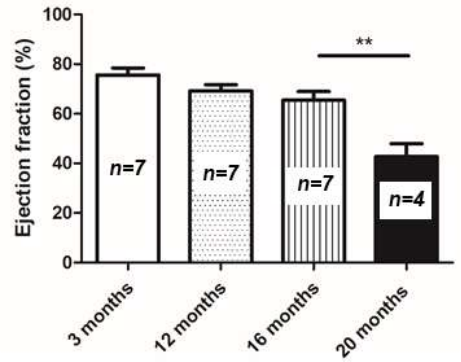


Figura 3. Declinul fractiei de ejectie la soareci in timpul imbatranirii naturale.

Programul: IDEI
Tipul proiectului: Proiecte de cercetare exploratorie
Cod proiect: ID_1325
Valoare totala contract/2009: 86.856,77 lei
Nr. Contract: 1005/2009

Titlul proiectului: Inflamatia si stresul oxidativ in ateroscleroza: mecanisme celulare si moleculare, identificarea si caracterizarea unor noi biomarkeri ai disfunctiei vasculare

Sinteza rezultatelor experimentale obtinute in anul 2009 conform anexei IIa din actul aditional nr.1 la contractul de finantare 1005/2009

Director de proiect: Dr. Adrian Manea

Obiective

Realizarea si caracterizarea unui model experimental de investigare in vitro a modificarilor celulare si moleculare induse de factorii pro-aterogeni in celulele peretelui vascular; Identificarea si analiza markerilor de disfunctie endoteliala si a celulelor musculare netede vasculare expuse conditiilor pro-inflamatorii.

Materiale si metode

Materiale

Reactivii folositi in experimente au fost procurati de la Sigma-Aldrich, Gibco-Life Technologies, Promega, Qiagen si Invitrogen. Anticorpii, siRNA si reactivii pentru imunoprecipitarea cromatinei au fost obtinuti de la Santa Cruz Biotechnology.

Culturi celulare

Celulele musculare netede (CMN) au fost izolate prin explanare din tunica media provenita din aorta toracala de fetus uman si caracterizate anterior (Tirziu si colab., 1999). Celulele (pasaj 8-12) au fost cultivate in DMEM ('Dulbecco's modified Eagle's medium') suplimentat cu 5 mM glucoza, aminoacizi esentiali si neesentiali, selenit de sodiu, acid ascorbic, 10 % ser fetal bovin (SFB) (v/v) si antibiotice (100 U/ml penicilina, 100 μg/ml streptomicina, 50 μg/ml neomicina).

Linia de celule endoteliale (CE) umane EAhy926 a fost procurata de la ATCC ('American Tissue Culture Collection'). CE au fost mentinute in conditiile descrise anterior.

Evaluarea viabilitatii celulare

Viabilitatea celulara a fost determinata prin metoda colorimetrica MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-zyl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide]. Celulele endoteliale si musculare netede au fost cultivate pe placi de 24 godeuri la o densitate de 25.000 celule/godeu si mentinute in conditiile descrise anterior. La sfarsitul perioadei de incubare s-a adaugat 10 μl solutie MTT (5 mg/ml) timp de 3 ore. Cristalele de formazan

au fost dizolvate in solutie de izopropanol suplimentata cu 10% Triton x-100 si 0.1 N HCl. Absorbanta a fost masurata spectrofotometric la 540 nm cu referinta la 630 nm.

Evaluarea productiei intracelulare de specii reactive de oxigen

Productia de specii reactive de oxigen in CMN si CE intacte a fost evaluata cu ajutorul indicatorului fluorescent DCF (Li si Shah, 2002). Celulele au fost incarcate cu DCFH-DA (5 μM) timp de 30 min la 37 ºC, detasate si resuspendate in tampon HEPES salin pH 7.4 (HBSS): NaCl 145 mM, KCl 5 mM, $CaCl_2$ 1.8 mM, $MgCl_2$ 1 mM, Na_2HPO_4 1 mM, glucoza 5 mM, HEPES 25 mM. Intensitatea de fluorescenta a DCF a fost monitorizata la λ_{em} = 535 nm si λ_{em} = 485 nm. Productia de ROS a fost calculata din raportul unitati relative de fluorescenta (RFU)/μg proteina totala si exprimata in unitati arbitrare.

Determinarea activitatii NADPH oxidazelor

Activitatea NADPH oxidazelor a fost evaluata in omogenate celulare prin chemiluminsicenta conform protocolului descris anterior (Ungvari si colab., 2003). Amestecul de reactie a constat in: tampon fosfat 50 mM pH 7.0, EGTA 1 mM, lucigenina 5 μM, NADPH 100 μM. Reactia a fost initiata prin adaugarea omogenatului celular (100-150 μg proteina) iar emisia de lumina a fost monitorizata timp de 15 min, 25 ºC cu ajutorul unui luminometru (Tecan). Specificitatea reactiei pentru superoxid a fost evaluata cu ajutorul unor agenti de neutralizare O_2^- si inhbitori enzimatici: superoxid dismutaza 300 U/ml, tiron 1mM, DPI – iodura de difenilen 100 μM, alopurinol 100 μM, L-NAME 50 μM si rotenona 50 μM. Productia de O_2^- a fost calculata din raportul unitati relative de lumina (RLU)/μg proteina totala si exprimata in unitati arbitrare.

Real time PCR

ARN-ul celular total a fost extras din CMN cu ajutorul unui kit Sigma. Sinteza ADN complementar (ADNc) a fost realizata folosind: 1 μg ARN total, 0.2 mM dNTP mix, 300 ng primeri random, 10 mM DTT, 80 U inhibitor recombinant de RNaze si 200 U M-MLV revers transcriptaza. In volum final de 50 μl. Reactia de revers transcriptie a fost realizata la 37 ºC (50 min) urmata de inactivare la 70 ºC (10 min). Cuantificarea expresiei ARNm a fost realizata prin amplificarea ADNc intr-o masina PCR Opticon 2 (MJ

Research) folosind indicatorul fluorescent SYBR Green I. Conditiile de amplificare au fost optimizate la: 0.2 μM din primeri sens/antisens, 2.5 mM $MgCl_2$, temperatura de hibridizare 58 ºC, temperatura de elongare 72 ºC, 40 cicluri. Gena GAPDH a fost folosita pentru normalizarea interna. Cuantificarea relativa a expresiei ARNm a fost realizata prin metoda comparativa C_T descrisa anterior (Pfaffl, 2001). Nivelul ARNm a fost exprimat in unitati arbitrare.

Analiza Western-blot

Culturile de celule au fost spalate de 2x cu PBS pH 7.4 (4 ºC), resuspendate in tampon de solubilizare (2xLaemmli) si incubate timp de 20 min la 100 ºC. Concentratia proteica a fost determinata prin metoda Amido Black. Proteinele (70 μg) au fost separate prin electroforeza denaturanta de SDS-poliacriamida (SDS-PAGE): 10%-Nox1, 8% - Nox4 sau 12% - HSP27 si transferate pe membrana de nitroceluloza. Membranele au fost expuse timp de 1 ora la 25 ºC in tampon de blocare (TBS Blotto A - Santa Cruz) iar apoi incubate cu anticorpii primari (IgG policlonal de iepure anti-Nox1, anti-Nox4 si anti-HSP27uman) timp de 12 ore (4 ºC) si anti-IgG de iepure cuplat cu HRP timp de 1 ora (25 ºC). Detectia benzilor proteice a fost realizata cu sistemul de chemiluminiscenta (Pierce) si analizate cu ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech. Cuantificarea expresiei proteice Nox1 si Nox4 a fost realizata prin normalizare la β-actina.

Dozarea activitatii superoxid dismutazei

Activitatea totala SOD a fost deterimnata prin metoda reducerii sarurilor de tertrazoliu de catre O_2^- ('NBT- nitroblue terazolium') utilizand un kit dezvoltat de Fluka. Reactia enzimatica a fost monitorizata la 450 nm cu ajutorul unui spectrofotometru (Tecan). Activitatea totala SOD a fost exprimata ca unitati arbitrare.

Evaluarea nivelului de glutation redus

Nivelul de GSH a fost detectat prin chemiluminiscenta cu ajutorul unui kit dezvoltat de Promga si exprimat in unitati arbitrare.

Analiza statistica

Datele experimentale sunt exprimate ca media ± deviatia standard din cel putin trei experimente independente. Evaluarea statistica a fost realizata cu ajutorul programului ANOVA®. O valoare a lui $p < 0.05$ a fost considerata semnificativa din punct de vedere statistic.

Rezulate

Evaluarea viabilitatii celulare

Rezultatele masuratorilor au aratat ca in conditiile experimentale alese, concentratiile de Ang II (100 nM-1 μM), TNFα (5-20 nM), IFNγ, LDL-AGE (100 μg/ml) si LDLox (100 μg/ml) nu sunt citotoxice pentru celule.

Modularea productiei intracelulare ROS in CMN si CE de catre factorii pro-inflamatori

Pentru a investiga efectul conditiilor pro-inflamatorii asupra productiei intracelulare de ROS, CMN au fost stimulate pana la 24 ore cu diferite doze de Ang II (100 nM-1 μM) si respectiv TNFα (10-20 nM). Rezulatele experimentale au evidentiat faptul ca atat Ang II cat si TNFα induc o crestere semnificativa a productiei ROS intr-o maniera dependenta de doza si de timp. Un nivel semnificativ crescut de ROS a fost observat pentru 1 μM Ang II si respectiv 20 nM TNFα (Figura 1).

Pentru a stabili gradul de specificitate al acestui mecanism relativ la tipul celular, au fost intreprinse experimente similare folosind linia de celule endotelilale umane Eahy926. Analiza CE a demonstrat un profil similar cu cel manifestat de catre CMN in urma actiunii sustinute a Ang II sau TNFα (Figura 2).

Reglarea activitatii si expresiei Nox in conditii pro-inflamatorii

Relatia dintre productia de O_2^- si nivelul de expresie corespunzator subunitatilor NADPH oxidazelor fost investigata prin tehnica de chemiluminiscenta si real time PCR. Rezulatele experimentale au demonstrat faptul ca atat Ang II cat si TNFα induc o crestere semnificativa a productiei de O_2^- intr-o maniera dependenta de concentratia agonistilor si de timp. Nivelele de expresie ARNm Nox1, Nox4, p22phox, p47phox si p67phox au fost

cuantificate in CMN stimulate pana la 24 ore cu Ang II (1 μM) sau TNFα (20 ng/ml). Stimularea cu Ang II sau TNFα au indus o crestere semnificativa a nivelelor ARNm peste nivelul controlului: Nox1 (~ 5x si respectiv 2x), Nox4 (~ 3x si respectiv 6x), p22phox (~1.5x), p47phox (~ 1x si respectiv 1.5x), p67phox (~ 1x si respectiv 1.5x), atingand valoarea maxima la 6 ore (Figura 3).

Experimente similare au fost intreprinse utilizand drept agenti pro-inflamatori: IFNγ sau lipoproteine modificate pentru a simula conditiile patologice (LDLox- LDL oxidat, LDL-AGE-LDL modificat prin produsi de glicare avansata). Rezulatele experimentale au reliefat faptul ca stimularea CMN cu IFNγ determina cresteri semnificative ale productiei de superoxid ca urmare a activarii NADPH oxidazelor. De asemenea stimularea CMN cu 100 U/ml IFNγ a indus o crestere semnificativa nivelul ARNm si proteic corespunzator subunitatilor catalitice Nox1 si Nox4. Pentru validarea conditiilor experimentale alese si pentru a demonstra relatia biunivoca dintre inflamatie si stresul oxidativ in patogeneza bolilor cardiovasculare nivelele ARNm SOD2 si MMP9 au fos monitorizate in experimente paralele (Figura 4).

In mod asemanator incubarea CMN cu lipoproteine modificate patologic au deterimnat cresteri semnificative ale productiei de anion superoxid corelate cu nivele crescute de expresie genica si proteica a subunitatilor Nox (Figura 5).

Evaularea nivelului de expresie ARNm al unor biomarkeri cu caracter predictor al bolilor cardiovasculare

Pentru validarea conditiilor experimentale alese si pentru a demonstra relatia biunivoca dintre inflamatie si stresul oxidativ in patogeneza bolilor cardiovasculare au fost monitorizate in experimente paralele nivelele ARNm ale unor biomarkeri cu rol important in predictia si dezvlotarea leziunilor aterosclerotice (SOD1, SOD2, MMP9, MCP1, VEGF, HSP27). Analiza real time PCR a evidentiat faptul ca stimularea CMN cu agenti pro-inflamatori (1 μM Ang II, 20 ng/ml TNFα, 100 U/ml IFNγ, 24 h) determina cresteri semnificative a expresei genice corespunzatoare acestor molecule (Figura 6).

Evaluarea potentilaului antioxidant enzimatic si neenzmatic in conditii pro-inflamatorii

Pentru a evidentia efectul conditiilor proinflamatorii asupra starii redox celulare au fost monitorizate activitatea SOD totala si nivelul de GSH in CMN stimulate timp de 24h cu 1 μM Ang II, 20 ng/ml TNFα sau 100 U/ml IFNγ. Rezulatele experimentale au evidentiat o crestere accentuata a activitatii SOD pe fodul unei diminuari semnificative a nivelului GSH (Figura 7).

Analiza nivelului de expresie si organizare HSP27

Deorece nivelul de expresie si organizare a proteinelor chaperone au un rol deosebit de important in modularea unor functii celulare au fost intreprinse studii privind influenta factorilor pro-inflamatorii asupra acestor molecule in CMN. Rezulatele experimentale au reliefat faptul ca stimularea CMN cu diferite concentratii de TNFα (5-20 ng/ml) sau IFNγ (100-1000 U/ml) au determinat cresteri semnificative a nivelului proteic (stimulare 24 h), totodata fiind remarcata apartia unor forme complexe de organizare – agregate (dimeri/multimeri) intre 45 – 27 kDa. De asemnea stimularea de scurta durata (1 h) a indus o crestere evidenta a nivelului de fosforilare (activare) HSP27 (Figura 8).

Concluzii

Experimentele intreprinse au avut drept scop stabilirea conditiilor optime in vederea elucidarii mecanismelor celulare si moleculare implicate in dezvoltarea placii ateromatoase cat si a investigarii relatiei dintre stresul oxidativ si inflamator. Rezultatele stiintifice preliminare obtinute pana in prezent vor contribui la extinderea cunostintelor actuale asupra proceselor fundamentale implicate in procesul de aterogeneza.

Bibliografie

1. Tirziu D, Jinga VV, Serban G, Simionescu M. The effects of low density lipoproteins modified by incubation with chondroitin 6-sulfate on human aortic smooth muscle cells. Atherosclerosis 1999; 147: 155-166.

2. Li, J.M., Shah, A.M. Intracellular localization preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. J. Biol. Chem. 2002; 277, 19952–19960.

3. Ungvari Z, Csiszar A, Edwards JG, Kaminski PM, Wolin MS, Kaley G, et al. Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia. Role of tumor necrosis factor-α, NAD(P)H oxidase, and inducible nitric oxide synthase. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23: 418-424.

4. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29: 2002-2007.

Figuri

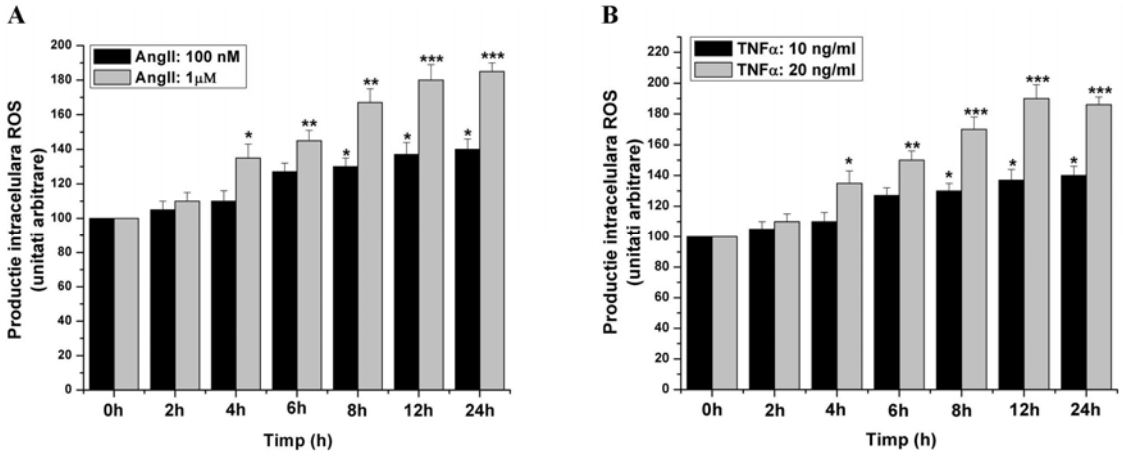


Figura 1: Efectul Ang II (A) si TNFα (B) asupra productiei intracelulare de ROS in CMN; n=3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

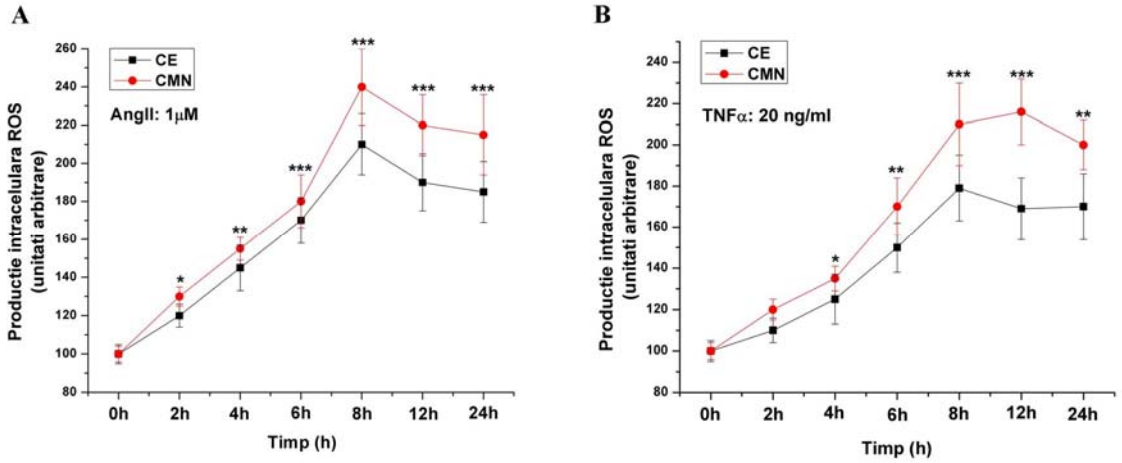


Figura 2: Analiza comparativa a actiunii (in timp) Ang II (A) si TNFα (B) asupra productiei intracelulare de ROS in CMN si CE; n=3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

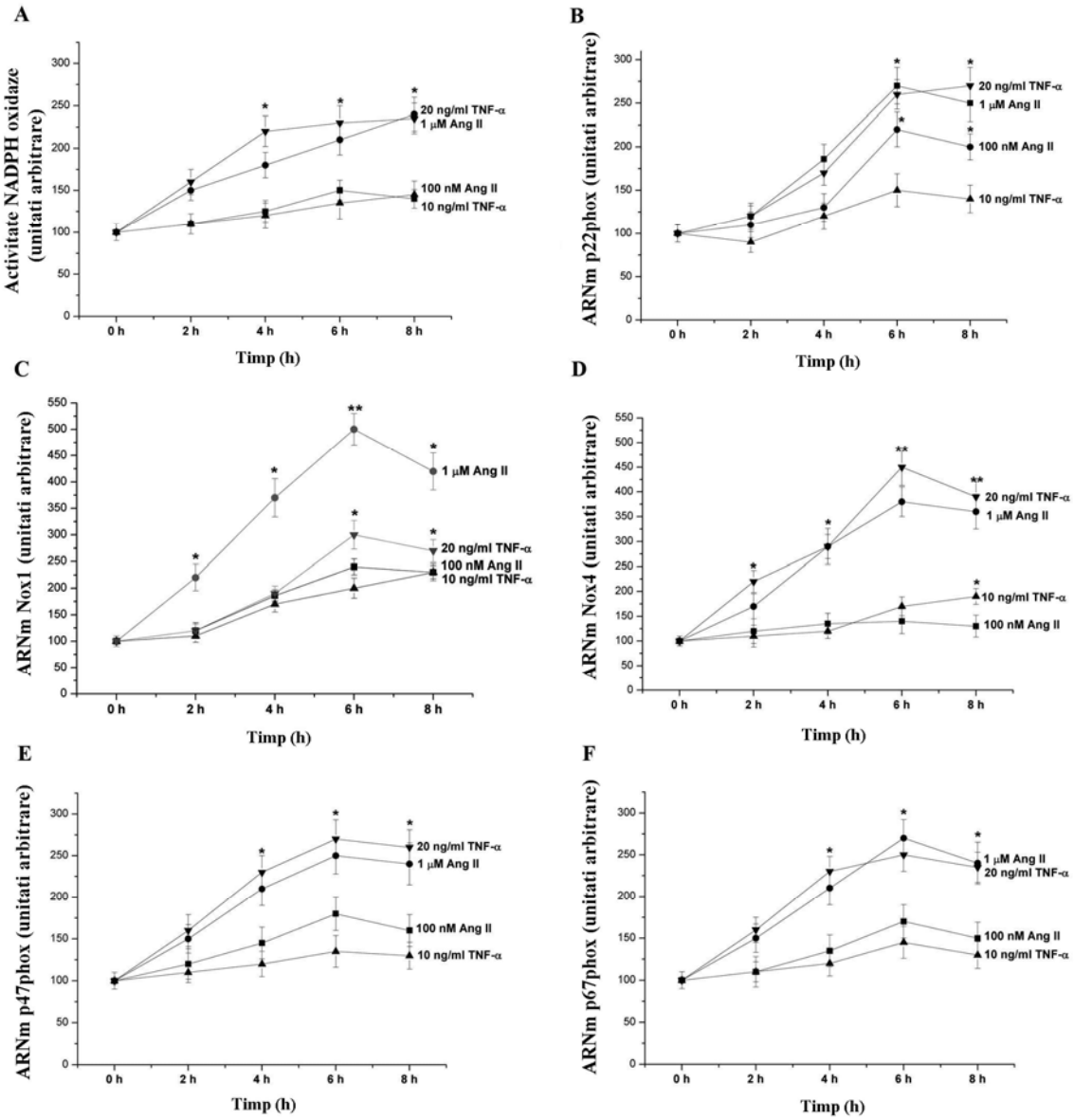


Figura 3: Modularea activitatii NADPH oxidazelor (A) si expresiei genice corespunzatoare subunitatilor p22phox (B), Nox1 (C), Nox4 (D), p47phox (E), p67phox F) de catre Ang II si TNFα. n=5, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

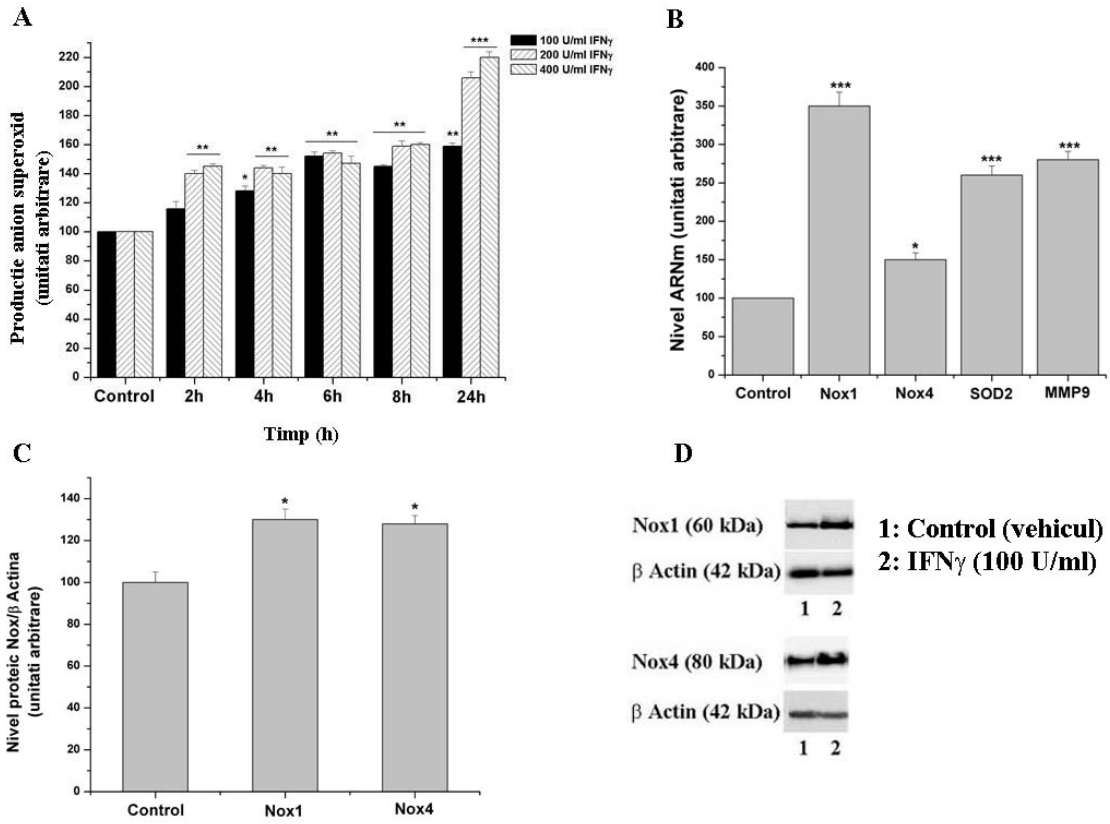


Figura 4: Modularea expresiei si functiei NADPH oxidazelor in CMN stimulate cu IFNγ. Analiza de tip doza-timp a productiei de O_2^- dependenta de NADPH (A); Modularea expresiei genice Nox1, Nox4, SOD2, MMP9 (B) si proteice Nox1, Nox4 (C). Imunobloturi reprezentative privind reglarea proteica Nox1 si Nox4 (D); n=5, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

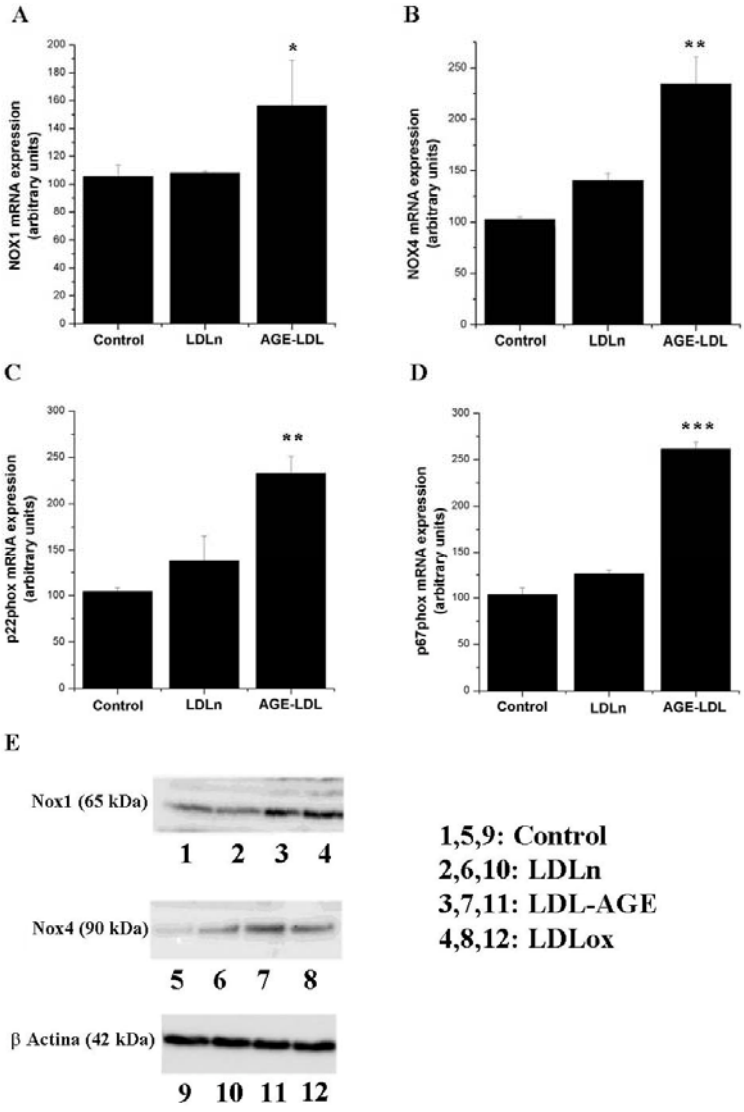


Figura 5: Reglarea nivelului ARNm Nox1 (A), Nox4 (B), p22phox (C), p67phox (D) de care LDL-AGE in CMN; Imunobloturi reprezentative ilustrand modularea expresiei Nox1 si Nox4; n=3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

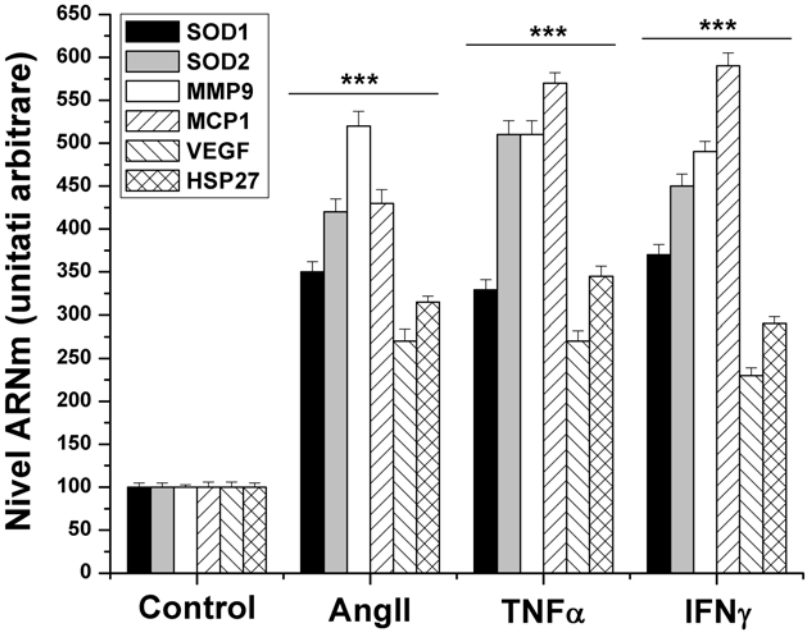


Figura 6: Reglarea expresiei ARNm SOD1, SOD2, MMP9, MCP1, VEGF si HSP27 in CMN de catre AngII, TNFα si IFNγ; n=3, *** $p < 0.001$.

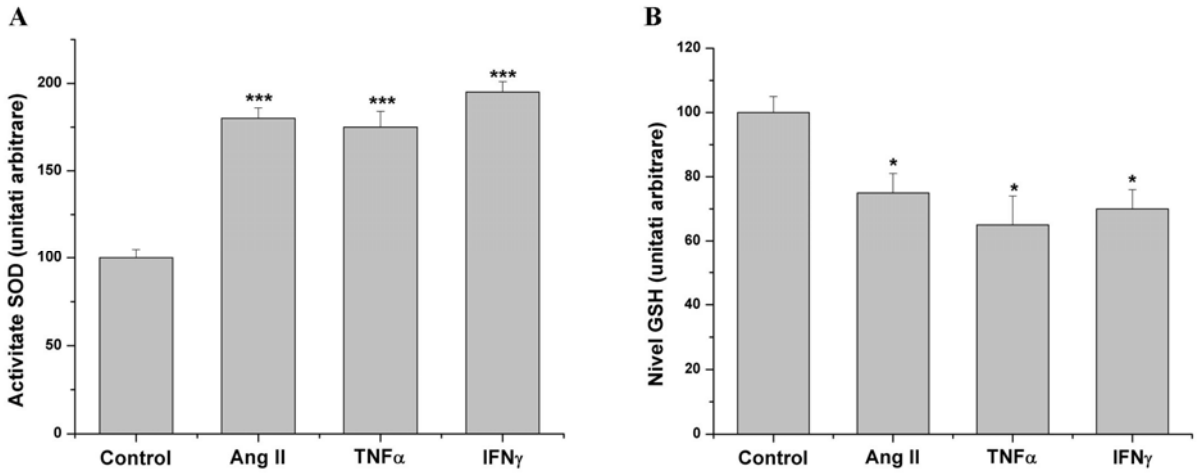


Figura 7: Modularea activitatii SOD totale si a nivelului GSH in CMN de catre AngII, TNFα si IFNγ; n=3, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

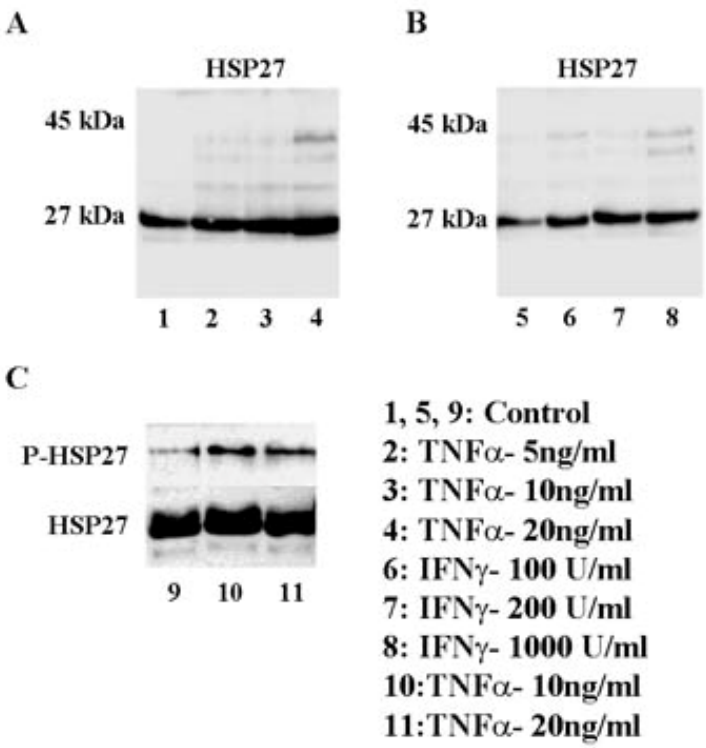


Figura 8: Evalularea expresiei proteice HSP27 (A), a nivelului de organizare (B) si a gradului de fosforilare in CMN mentinute in conditii pro-inflamatorii.

3D BIOPRINTING OF HUMAN STEM CELLS TO CONSTRUCT BLOOD VESSEL STRUCTURES

Florin Iordache[1], Dorin Alexandru[1], Petruta Gurban[2], Horia Maniu[1]

[1]*Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" of Romanian Academy, Bucharest, Romania*
[2]*Institute of Virology " Stefan N Nicolau" of Romanian Academy, Bucharest, Romania*

THE 43rd FEBS CONGRESS PRAGUE 7-12 JULY 2018
FEBS YSF 2018 PRAGUE
11/ P.05-006

INTRODUCTION Three dimensional (3D) bioprinting combines cells, growth factors, and biomaterials to reconstruct living tissue and organs preferably using the patient's own cells. The aim of this study was to create blood vessel-like structures using human amniotic fluid stem cells (AFSC) and BioInk® hydrogel.

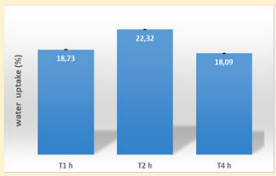
BIOMATERIALS

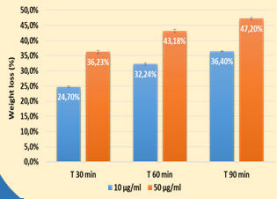
CELL INK

BioInk® (RegenHU) is a semi-synthetic hydrogel based on collagen, hyaluronic acid and polyethylene glycol. It is sterile and photopolymerizable.

$$\text{Wateruptake} = \frac{Ww - Wd}{Wd(g/g)}$$

The weight of the hydrogel increased by 22% at 2 hours after immersion in PBS.





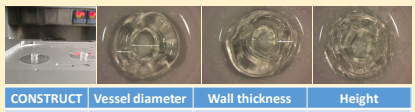
Enzymatic degradation showed that in the presence of collagenase (50 µg/ml), the construct decreased by 47.2%. The hydrogel used has the ability to take up water and is biodegradable.

3D BIOPRINTING

Printer parameters

Diameter	Number of layers	Pressure	UV	Speed rate	Temperature	Needle
2.5 mm	10	1.1 bar	5 sec/layer	1mm/sec	18ºC	0.2 mm

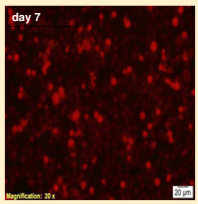
Printing was done using a 0.2 mm diameter needle, under 1.1 bar pressure, 1 mm/sec speed rate, diameter of vascular tubes 2.5 mm, thickness and height of each layer 0.3 mm, followed by 5 seconds polymerization of each layer. Bioprinted blood vessel constructs have a mean diameter of 2.46 ±0.41 mm, with a mean wall thickness of 1.43 ±0.10 mm and a mean height of 2.73 ± 0.05 after 10 printed layers.

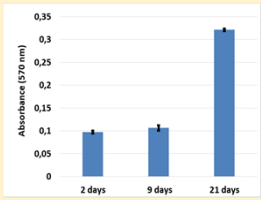


CONSTRUCT	Vessel diameter	Wall thickness	Height
Construct 1	2.95 mm	1.43 mm	2.73 mm
Construct 2	2.24 mm	1.49 mm	2.82 mm
Construct 3	2.21 mm	1.28 mm	2.84 mm

STEM CELLS

Amniotic fluid stem cells (2 million AFSC) were mixed with 1 ml BioInk hydrogels and printed in vessel structure model with defined line spacing. AFSC were stained with cell tracker Red CMTPX and analyzed by fluorescent cells. microscopy. MTT test was used to evaluate the viability of the amniotic fluid stem cells.

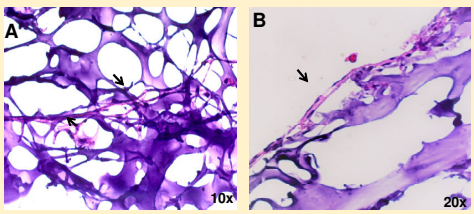




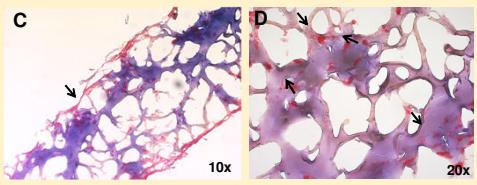
The fluorescent microscopy images confirm the MTT biochemical test, showing that the viability is maintained after 21 days of cultured in BioInk® hydrogel.

AFSC have a great potential in cardiovascular regeneration demonstrated by their ability to form capillary-like networks when cultivated in hydrogels. Our results showed that AFSC express mesenchymal markers such as CD73 (92%), CD90 (98%), CD105 (67.5%). After 21 days of culture in endothelial media (EBM2) the immunophenotype did not show changes in surface markers. Cryosections (5 µm) of the vessel constructs showed that the BioInk hydrogel has a porous structure with large lacunae that allow attachment and growth of AFSC.

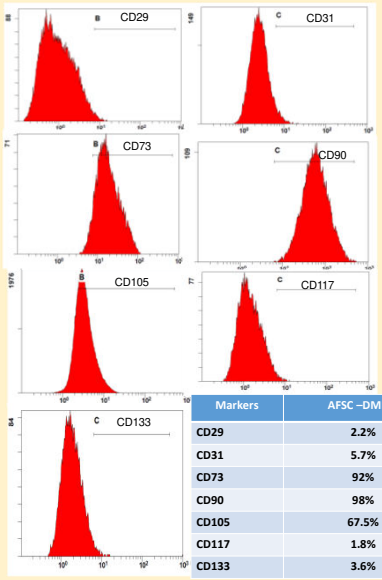
Hematoxylin and Eosin staining (A and **B)** showed that cells are able to connect with each other, the dimension of pores provided a favorable scaffold for cells to growth and proliferate.



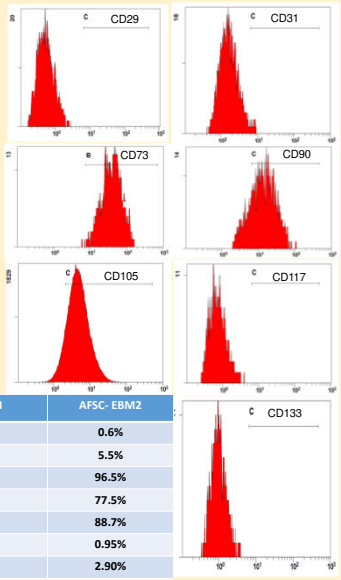
Trichromic Masson staining (C and **D)** revealed that AFSC are able to infiltrate and adhere to BioInk hydrogel, being anchored to the hydrogel network. The collagen is colored in blue and AFSC in red.



AFSC-DMEM



AFSC-EBM2



Markers	AFSC –DMEM	AFSC- EBM2
CD29	2.2%	0.6%
CD31	5.7%	5.5%
CD73	92%	96.5%
CD90	98%	77.5%
CD105	67.5%	88.7%
CD117	1.8%	0.95%
CD133	3.6%	2.90%

In conclusion BioInk hydrogel enables growth of AFSC being a good printable biomaterial for vascular tissue engineering. For understanding the blood vessel development, functional analyzes of these constructs (contractibility and elasticity by myograph techniques) and experiments using animal models will be performed.

Acknowledgements. This work was supported from the Project PN-III-P1-1.1-PD-2016-1660, BIOPRINT. E-mail: floriniordache84@yahoo.com

ROMANIAN ACADEMY
INSTITUTE OF CELLULAR BIOLOGY AND PHATOLOGY
„NICOLAE SIMIONESCU”

EXPRESSION AND FUNCTION OF INFLAMMATORY MARKERS ASSOCIATES WITH CARDIOVASCULAR PATHOLOGY

ABSTRACT THESIS

Scientific coordinator:

Acad. MAYA SIMIONESCU

PhD student:

GAN ANA-MARIA

BUCHAREST
2012

CONTENTS

Foreword

Introduction

Part I

KNOWLEDGE OF CARDIOVASCULAR PATHOLOGY ASSOCIATED INFLAMMATORY PROCESS

I. Characteristics of inflammatory process associated cardiovascular pathology

I. 1. Inflammatory mechanisms in atherogenesis

I. 2. The role of innate immune effectors and adaptive immune system in inflammatory process associated with atherosclerosis

I. 3. Receptors/mediators of the inflammatory process

I.3. 1. Pentraxin immunomodulator in atherogenesis

I.3. 2. Toll-like receptors (TLR) involved in vascular inflammation

I.3. 3. Cytoplasmic receptors NOD (nucleotide-binding domain-like); association inflamazom system in inflammatory cytokine sinthesis

II. The role of cytokines in vascular inflammation; signaling mechanisms induced by pro-inflammatorycytokines

II. 1. TNF-α modulator of inflammation in vascular wall cells

II. 2. Interleukins-1 family (IL-1) exacerbates vascular inflammation

II. 3. Interleukina-6 (IL-6) factor de risc in boala cardiovasculara

II. 4. Trans signaling in cardiovascular inflammation

II. 5. Resistin - role in inflammation associated with cardiovascular disease

II. 6. STAT - signaling mediates cross-talk between IFN-γ and TLR in cardiovascular disease

II. 7. Regulators of cytokine-induced signaling

III. Chemokines - mediators of vascular cell-leukocyte interaction; markers in cardiovascular disease

III. 1. Vascular inflammation modulated by chemokine/receptor axis *MCP-1*(CCL2)/*CCR2*

III. 2. CX3CL1/CX3CR1 axis - involved in cross-talk between vascular cells-leucocytes

IV. Diabetes - cardiovascular risk factor

IV. 1. Pro-atherogenic mechanisms associated with hyperglycemia

Part II ORIGINAL CONTRIBUTIONS

- **Objectives**

I. High glucose induce fractalkine and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) expression in smooth muscle cells

I.1. MCP-1 and fractalkine expression and functional role in human smooth muscle cells (CMN) activated by high glucose concentration

a. Introduction and objectives
b. Materials and methods
c. Results
d. Discussion and conclusions

I.2. Signaling pathways involve in chemokines MCP-1 and fractalkine expression induces by high glucose in smooth muscle cells

a. Introduction and objectives
b. Materials and methods
c. Results
d. Discussion and conclusions

II. *CX3CL1/CX3CR1* axis involved in cross talk between smooth muscle cells and monocytes; exacerbating pro-inflammatory molecules

II.1. Cross talk human smooth muscle cells/ monocytes involved in exacerbate inflammatory response

a. Introduction and objectives
b. Materials and methods
c. Results
d. Discussion and conclusions

II.2. Signaling pathways involved in monocyte-CMN interaction dependent by *CX3CL1/CX3CR1* axis

a. Introduction and objectives
b. Materials and methods
c. Results
d. Discussion and conclusions

III. Inflammatory effect of resistin in smooth muscle cells; modulating the expression and fractalkine/CX3CR1 involving of TLR4 and protein Gi-dependent signaling pathway

III.1. Resistin modulates CX3CL1/CX3CR1 expression in smooth muscle cells dependent by NF-kB, AP-1 and STAT transcription factors

a. Introduction and objectives
b. Materials and methods
c. Results

d. Discussion and conclusions

III.2. Resistin induced suppressors of cytokines signaling (SOCS) expression in smooth muscle cells

a. Introduction and objectives
b. Materials and methods
c. Results
d. Discussion and conclusions

IV. Investigation of the molecular mechanisms involved in regulating fractalkine expression associated atherogenic processes

IV.1. *In silco* promoter analysis and cloning of human fractalkine; transcription factors involved in gene regulating

a. Introduction and objectives
b. Materials and methods
c. Results
d. Discussion and conclusions

General conclusions
Abstact thesis
Bibliography
List of published papers
List of papers presented at scientific meetings
Grants

Keywords: Cardiovascular disease, atherosclerosis, inflammation, inflammatory markers, cytokine, chemokines, diabetes, resistin, fractalkine, MCP-1, human vascular smooth muscle cells, monocytes, cell-cell cross talk, MAPK-kinase, inflammatory transcription factors, promoter.

Cardiovascular disease with metabolic dysfunction, is the main socio-medical problem in developed countries. The number of patients with cardiovascular diseases is increasing, which requires improved prognostic algorithm by linked molecular risk factors with disease status and elucidating cellular and molecular mechanisms associated with them, as well as identifying new therapeutic strategies. Traditional risk factors involved in cardiovascular pathologies are diabetes, hyperlipidemia, obesity, hypertension and recently inflammatory processes have also been associated.

Pathological process leading of cardiovascular disease is **atherosclerosis**. Atherosclerosis is a multifactorial disease whose pathogenesis is still not fully understood, but complex cellular inflammation and its processes play an important role in the progression of the lesion. Atherosclerosis involves complex interactions between inflammatory cells (neutrophils, lymphocytes, monocytes/macrophages) and vascular cells (endothelial cells, smooth muscle cells). Inflammation is an independent risk factor for atherosclerosis, but the mechanisms involved are still unknown.

Immuno-inflammatory mechanisms are directly involved in the initiation and progression of cardiovascular disease (CV) from early asimtomatic stage *vascular injury* to clinical manifestations of *dysfunction* and *vascular remodeling*. Because vascular injury is in part reversible identification of inflammatory phenotype is essential to suppress inflammatory processes and development new therapeutic strategies. Inflammatory process of atherosclerotic lesion involves the participation of *molecular effectors* (pattern recognition receptors, inflammatory bioactive molecules) and *cellular effectors* (monocytes/macrophages, lymphocytes, antigen presenting cells and dendritic cells). Moreover, mediators involved in modulating inflammatory processes may be ***markers of vascular inflammatory processes***, and potential therapeutic targets. Through advanced technologies of proteomics, metabolomics and genetics has been: i) identified putative biomarkers or risk factors; ii) developed therapeutic targets; iii) enriched previously developed effective therapies, so that some biomarkers are experimental standard, closely correlated with disease status. Highlighting specific molecular signaling mechanisms involved in the expression and action of these markers in vascular cells have not yet been elucidated.

Trying to provide new data contribute to the development the mechanisms associated inflammatory atherosclerosis, this paper aims to identify the molecular mechanisms involved in the modulation of the inflammatory response of vascular cells wall. Identification of inflammatory

molecular mechanisms is required for early screening of patients with cardiovascular disease and monitoring anti-inflammatory therapy by quantification of inflammatory biomarkers but also may use in the development of targeted therapies.

In the first part of the thesis "The current state of knowledge", are presented through four chapters various features of the inflammatory process associated cardiovascular pathology.

Chapter I describes inflammatory mechanisms associated atherogenesis and the role of innate immunity effectors and adaptive immune system in inflammatory process. Innate immune mechanisms are pivotal role in initiating atherosclerosis by activating "pattern-recognition receptors" (PRR), that promotes the inflammatory response. In response to the binding and activation PRR are released immune *effectors of innate immunity* as well as a *peptides* (CRP, complement system), *nitric oxide* (NO), *eicosanoides* (prostaglandins and leukotrienes) and *inflammatory molecules* (cytokines, chemokines). Also, multiple studies indicate the important role of ***antigen-specific*** response in atherosclerosis modulated by effectors of adaptive immunity. Thus, the adaptive immune system can influence atherogenic processes in three different pathways: i) *cell-cell interactions* between antigen-presenting cells, macrophages, lymph B or T and CD; ii) *cytokine release* by activated lymph T, that mediates activation of macrophages and other cells of the plaque; iii) *antibody secretion* by lymph B dependent / independent of lymph T.

Chapter-II presented the role of cytokines in vascular inflammation and signaling mechanisms induced by pro-inflammatory cytokines. Increased levels of inflammatory cytokines keep inflammatory status associated vascular dysfunction in diseases such as atherosclerosis, hypertension, abdominal aortic aneurysm and varicose veins. Biological effects of pro-inflammatory cytokines TNF-α, IL-1 and IL-6 is reflected in the inflammatory mechanisms associated with atherosclerosis.

Chapter III describes **chemokines** as mediators in vascular cell-leukocyte interaction.

Chemokines are chemotactic mediators for different subpopulations of leukocytes but also nonhematopoietic cells cells (CMN) in response to inducers stimuli. Chemokines and chemokine receptors comprise a complex system that attract specific leukocyte subsets in each step of the atherogenic process. Recruitment of leukocyte subsets site involves various inflammatory chemokines, involved in heterophilic interactions with proteoglycan. Recent studies have shown that circulating levels of chemokines may be associated with various inflammatory diseases, as well as **MCP-1** is independent prognostic factor in acute coronary syndrome. Vascular inflammation can be modulated by axis chemokine/receptor ***MCP-1***(CCL2)/***CCR2*** and strategies such as gene therapy (MCP-1 gene deletion) or pharmacological targeting reduces the inflammatory response thus, MCP-1 can be both **prognostic marker** and **therapeutic target**. CX3CL1/CX3CR1 axis may also be involved in the dialogue between vascular cells-leukocytes, immunohistochemical studies confirmed the presence of CX3L1/CX3CR1 axis in the coronary atherosclerotic plaque

(monocytes/macrophages, CE, CMN). Smooth muscle cells (CMN) of atherosclerotic plaque neointima express CX3CR1 which demonstrates that CMN migrate from the media to intima by CX3CL1-dependent gradient. CX3L1/CX3CR1 axis mediates anchoring of monocytes/macrophages to CMN in the plaque, which supports therapeutic targeting of this pro-inflammatory pathways in cardiovascular disease. In conclusion, the *Fk/CX3CR1 axis* can be considered the most promising target for therapeutic intervention to pro-inflammatory atherosclerosis process but intracellular signaling mechanisms must be fully understood to develop a new class of anti-inflammatory agents.

Chapter-IV presented diabetes as a major cardiovascular risk factor independently associated complications micro/macrovascular by accelerating atherosclerotic process. Both diabetes and atherosclerosis are multifactorial conditions that seem to have a common inflammatory basis because both diseases are released *acute phase inflammatory markers* (CRP, IL-6 sialic acid, amyloid A, cortisone) specific innate immunity. Both diabetes and atherosclerosis are multifactorial conditions that seem to have a common inflammatory basis because both diseases are released acute phase inflammatory markers (CRP, IL-6 sialic acid, amyloid A, cortisone) specific to innate immunity.

In the attempt to find cellular and molecular mechanisms of inflammation associated with atherosclerotic processes, and to develop a therapeutic strategy to reduce this process with an important role in initiating subsequent cardiovascular disease, this paper focused in second part II of the thesis **"original contributions"** on the following main objectives:

I. The role of high glucose concentration in smooth muscle cells in exacerbate inflammation and modulating effect of fibrates (PPARα activators) in the expression and function of chemokines (MCP-1 and fractalkine).

II. Cellular signaling pathways involved in smooth muscle cells activation by high glucose and regulates expression of chemokines (MCP-1 and fractalkine).

III. Cross talk between smooth muscle cells and monocytes via CX3CL1/CX3CR1 axis augments expression of pro-atherogenic molecules

IV. Signaling pathways involved in cross talk CMN-monocyte dependent by CX3CL1/CX3CR1axis.

V. The role of resistin in modulating smooth muscle cell phenotype; molecular mechanisms involved in the action of resistin on vascular smooth muscle cells.

VI. Characterization of functional promoter of human fractalkine.

In **Chapter I** included studies on the effects of high glucose concentration in modulating MCP-1, fractalkine expression in smooth muscle cells and functional role of these chemokines, monocyte adhesion and cells chemotaxis to CMN activated by high glucose. In addition, we investigated effect of PPAR-α activators (fenofibrate and clofibrate) in fractalkine and MCP-1

expression in human smooth muscle cells exposed to high glucose concentration but also signaling mechanisms involved.

Our results shown high glucose concentration increased fractalkine and MCP-1 expression in human smooth muscle cells dependent to the concentration of glucose. The results support previous studies that have identified fractalkine in the intima. Furthermore, activators of PPAR-α , **fenofibrate** and **clofibrat** also reduced gene/protein expression of MCP-1 and fractalkine in CMN activated by high glucose. High glucose effect is reflected by the increased number of monocytes adhered to CMN by functional chemokines MCP-1 and fractalkine. The adhesion of monocytes to CMN activated by high glucose is dependent by chemokines, inhibition of signaling with *pertussis toxin* reduces the number of monocytes adhered in continuous laminar flow conditions. In particular, the role of MCP-1 and fractlkine is underlined by experiments in which of these chemokine receptors were blocked (by incubation with specific antibodies), which led to a decrease in the number of monocytes adhered.

Signaling mechanism involved in MCP-1 and fractalkine overexpression induced by high glucose-induced promote phosphorylation ERK1/2, p38MAPK protein kinases and translocation NF-kB/AP-1 transcription factors dependent by reactive oxygen species (ROS) released. Inhibition of reactive oxygen species with PDTC and DPI reduced activation of ERK1 /2 and p38 MAPK, suggesting the involvement of oxidative stress in MAPK activation. Also, inhibit p38MAPK and ERK1/2 kinases with specific inhibitor (SB203580 or PD98095) reduces phosphorylation of ***IkBα*** and ***c-jun*** suggesting role p42/44MAPK and p38MAPK in activating NF-kB and AP-1 respectively. Furthermore, we studied the role of NF-Kb/AP-1 transcription factor in MCP-1 and fractalkine expression by transient transfection of CMN with oligodeoxinucleotide for p65 and c-Jun. Blocking binding sites of NF-kB and AP-1 reduces protein expression of MCP-1 and fractalkinei, suggesting the involvement of transcription factors in modulating both chemokines. Clofibratul and fenofibrate reduces phosphorylation/ activation of p38MAPK and ERK1/2 kinases, that is prevented translocation of transcription factors NF-kB and AP-1 redcuced MCP-1 and fractalkine release.

In conclusion, the studies in this chapter demonstrate that activation of vascular CMN induced overexpression of chemokines, induces increased adhesive interactions between monocytes and CMN,; study may explain one of the mechanisms induced accelerated atherosclerosis in diabetic conditions.

In **Chapter II** we investigated the role ***CX3CL1/CX3CR1*** axis in cross talk between smooth muscle cells and monocytes and involvement this pathway in excessive expression of proinflammatory molecules, based on previous studies providing expression of fractalkine and CX3CR1 receptor in the coronary atherosclerotic plaque. Thus we assumed that the interaction between CMN and monocytes can be achieved through *fractalkine-CX3CR1* which may influence

each cell type by modulating inflammatory molecules with important role in atherosclerotic plaque progression.

The results demonstrates the cross talk between CMN/monocytes or CMN/activated monocytes with LPS (lipopolysaccharide) increased expression of TNF-α, IL-1β IL-6, CX3CR1 and MMP-2, -9 in both cell types and additional activate of monocytes with LPS exacerbates TNF-α, CX3CR1 and MMP-9 expression. Modulation of TNF-α CX3CR1 and MMP-9 expression is dependent by *fractalkine-CX3CR1 axis* while the expression of IL-1β, IL-6 and MMP-2 is independent of this receptor-ligand pair. Cross talk CMN/monocyte-activating p38MAPK kinase which successive transduction NF-kB and AP-1 transcription factors which induced the production of pro-atherogenic molecules (cytokines and MMP). Communication between CMN-monocytes by binding fractalkine recepors is dependent by transduction ***AP-1*** transcription factor involved in regulating the expression of pro-atherogenic molecules TNF-α, MMP9 and CX3CR1.

The data of this study extend the known role of fractalkine and its receptor and suggest in atherosclerotic plaque smooth muscle cells interact direct with monocytes, amplify the inflammatory response by *fractalkine-CX3CR1 axis* induce progression of atheroma. Thus, ***CX3CL1-CX3CR1 pair*** may be a new therapeutic target to modulate inflammatory process associated with atherosclerosis.

In **Chapter III** we involved inflammatory effect of resistin in smooth muscle cells by modulating fractalkine and CX3CR1 expression dependent by TLR4 receptor.

The aim of this study was to investigate the role of resistin as a modulator of CMN phenotype and pro-inflammatory effects respectively. Since resistin and fractalkine are present in atherosclerotic lesions and CX3CR1 receptor is predominantly associated with CMN we hypothesized that resistin may be inducer of fractalkine (CX3CL1) expression and contribute both to CMN phenotype modulation (pro-inflammatory) and increased monocyte transmigration.

The results show that resistin may induce significant expression of CX3CL1 and CX3CR1 in vascular CMN, which demonstrates resistin inducing pro-inflammatory status and contribute to the development of atherosclerosis. Since resistin receptor in vascular cells is not yet known, experimental results of this study demonstrate that both anti-TLR4 and PTX inhibits CX3CL1 and CX3CR1 expression induced by resistin CMN vascular, suggesting that resistin may use both TLR4 receptors and Gi-proteins receptors in modulating these molecules.

In addition, the results of this study show that resistin activates p38MAPK and STAT3 but not ERK1/2. Pharmacological inhibitors of p38MAPK reduced significantly CX3CL1 and CX3CR1 expression in CMN activated with resistin. P38MAPK activation by resistin can induce translocation p65 and c-Jun subunits of NF-kB and AP-1 transcription factors. Moreover, *SP100030* inhibitor (dual inhibitor of NF-kB and AP-1) reduces fractalkine and CX3CR1, demonstrating the role of NF-kB and AP-1 in their regulation. Silencing p65 and c-Jun prior to resistin activation

reduces significantly expression of two molecules. Together these results indicate NF-kB and AP-1 are involved in resistin action to fractalkine and its receptor expression in the vascular CMN. The results demonstrate also that blocking JAK/ STAT pathway with specific inhibitor *WP-1066* or silencing STAT1/STAT3 with specific ODN, reduced CX3CL1 and CX3CR1 expression, demonstrates STAT transcription factors are involved in this process additionally to NF-kB and AP-1 action.

Chemotaxis experiments performed xCELLigence system demonstrates fractalkine induced by resistin is functional in transmigration of monocytes. Conditioned medium from CMN activated with resistin induced chemoatractant signal for monocytes. Addition of anti-CX3CL1 in conditioned medium reduces significantly the number of transmigrated monocytes. All these results show the chemotactic effect of soluble fractalkine released into the conditioning is dependent by CX3CR1 expression/interactions with monocytes.

In **Chapter IV** we designed experiments to reveal whether promoter activity and CX3CL1 expression is regulated by direct/indirect mechanisms of NF-kB, AP-1 and STAT1/STAT3 transcription factors.

In silico analysis of ***human CX3CL1 promoter*** indicate the existence of specific promoter elements *CCAC* and *TATA box*. Additionally, we identified binding sites relevant to vascular physiology and pathology including ***NF-kB***, ***AP-1***, ***GAS*** (STAT1/STAT3), ***C/EBP***, ***GATA*** and ***GAGA***. Analysis of deletion mutants of CX3CL1 revealed NF-kB, AP-1 and STAT1/STAT3 are not essential to the promoter activity in CMN but have role in modulating CX3CL1 expression in response to inflammatory stimuli. To investigate the function elements NF-kB, AP-1 and GAS we analyzed the activity of nuclear transcription factors by ChIP technique in CMN treated with resistin. The results indicated binding complex c-Jun, p65 and STAT1/STAT3 corresponding AP-1, NF-kB and GAS provided the many *non-canonical* interactions between proteins p65/NF-kB, c-Jun/AP-1 and STAT1/STAT3.

In conclusion, these results shows for the first time CX3CL1 human promoter characterization. The results demonstrate that complex interactions between NF-kB, AP-1 or STAT1/3 and associated pathways regulate directly/indirectly CX3CL1, mechanism may be responsible for CX3CL1 overexpression in human atherosclerotic plaque. These transcription factors are essential for many transducer cardiovascular risk factors and modulating regulators "up-stream" of the promoter CX3CL1 may represent an effective pharmacological strategy to reduce pro-inflammatory action of CX3CL1.

Together these results obtained in the "original contributions" underscores the importance of complex interactions of transcription factors, coactivators, and/or corepressors of fractalkine overexpression. Inhibition of "up-stream" kinase pathways (p38MAPK, JNK and JAK2) and suppression of transcription factors NF-kB, AP-1 and STAT1 / 3 by interference RNA technology

reduced fractalkine expression, depndent induced by resistin and high glucose. All these results show the importance of **NF-kB**, **AP-1** and **STAT1/3** signaling pathways in regulating expression of CX3CL1, which explains its presence in human atherosclerotic lesions dependent - resistin secreted by macrophages or hyperglycaemic conditions specific to diabetes.

Since this thesis is a predominantly fundamentally, goal of these studies is the application nature. The experiments can help elucidate the mechanisms of inflammatory atherosclerotic plaque, optimization of therapies to reduce inflammatory dynamic processes respectively.

Number of figures in the first part – 27

Number of original figures (second part) – 34

Indications bibliographic – 373

Papers published in international journals ISI – 9

Papers published in national journals CNCSIS – 1

Oral presentations at international scientific conferences – 2

Abstracts of papers presented at international scientific meetings – 30

Abstracts of papers presented at national scientific meetings – 4

Trainings and courses – 5

Participation to research projects - 4 national, 2 international

L'ACADÉMIE ROUMAINE
INSTITUT DE BIOLOGIE ET PATHOLOGIE CELLULAIRE
„NICOLAE SIMIONESCU"

MODULATION D'EXPRESSION ET FONCTION DES INFLAMMATOIRES MARQUEURS ASSOCIATES CARDIOVASCULAIRE PATHOLOGIE

RÉSUMÉ

Scientifique:

Acad. MAYA SIMIONESCU

PhD:

GAN ANA-MARIA

BUCAREST
2012

TABLE DES MATIÈRES

Avant-propos

Présentation

Partie I

ÉTAT DES CONNAISSANCES DE PROCESSUS INFLAMMATOIRE ASSOCIÉE CARDIOVASCULAIRE PATHOLOGIE

I. Caractéristiques de la processus inflammatoire associée cardiovasculaire pathologie

- I. 1. Mécanismes inflammatoires dans l'athérogenèse
- I. 2. Le rôle des effecteurs de l'immunité innée et adaptative du système immunitaire dans le processus inflammatoire associé à l'athérosclérose
- I. 3. Récepteurs/médiateurs du processus inflammatoire
  - I.3. 1. Pentraxine immunomodulateur dans l'athérogenèse
  - I.3. 2. Toll-like receptor (TLR) impliquée dans l'inflammation vasculaire
  - I.3. 3. Cytoplasmique récepteurs NOD (nucleotide-binding domain-like); association inflamasom système de cytokines inflammatoires

II. Le rôle des cytokines dans la modulation inflammatoires vasculaires; des mécanismes de signalisation induite par les cytokines pro-inflammatoires

- II. 1. TNF-α modulateur de l'inflammation dans les cellules vasculaire
- II. 2. Famille des interleukines IL-1 exacerbe l'inflammation vasculaire
- II. 3. L'interleukine-6 (IL-6) facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires
- II. 4. Le rôle de trans signalisation de l'inflammation cardiovasculaire
- II. 5. Résistine-rôle dans l'inflammation associée aux maladies cardiovasculaires
- II. 6. STAT - médiation de signalisation de cross-talk entre l'IFN-γ et TLR dans les maladies cardiovasculaires
- II. 7. Ajuster de signalisation induite par les cytokines

III. Les chimiokines - médiateurs de interaction vasculaire des cellules-leucocytaires; marqueurs de la maladie

- III. 1. L'inflammation vasculaire modulé par l'axe de chimiokine/récepteur *MCP-1* (CCL2)/ *CCR2*
- III. 2. L'axe CX3CL1/CX3CR1 - implication dans "cross-talkl" entre les cellules vasculaires, les leucocyte

IV. Diabète - facteur de risque cardiovasculaire

- IV. 1. Les mécanismes pro-athérogène associés hyperglycémie

Partie II CONTRIBUTIONS ORIGINALES

- **Objectifs**

I. Augmentation de la glucose induire fractalkine et „monocyte chemotactic protein-1" (MCP-1) dans les cellules musculaires lisses

I.1. L'expression de chimiokines MCP-1 et fractalkine dans les cellules musculaires lisses (CMN) activé de glucose et rôle fonctionnelle de ces

a. Introduction et objectifs
b. Matériaux et méthodes
c. Résultats
d. Discussion et conclusions

I.2. Les voies de signalisation par lequel l'hyperglycémie induit l'expression de chimiokines MCP-1 et fractalkine dans les cellules musculaires lisses

a. Introduction et objectifs
b. Matériaux et méthodes
c. Résultats
d. Discussion et conclusions

II. *CX3CL1/CX3CR1* axe impliqué dans le dialogue entre les cellules musculaires lisses et les monocytes, ce qui aggrave l'expression de molécules pro-inflammatoires

II.1. Interaction des cellules musculaires lisses humaines et les monocytes contribuent à accentuer réponse inflammatoire

a. Introduction et objectifs
b. Matériaux et méthodes
c. Résultats
d. Discussion et conclusions

II.2. Voies de signalisation impliquées dans l'interaction CMN-monocytes dépendante de *CX3CL1/CX3CR1*axe *CX3CR1*

a. Introduction et objectifs
b. Matériaux et méthodes
c. Résultats
d. Discussion et conclusions

III. Inflammatoire de la résistine dans les cellules musculaires lisses; en modulant l'expression fractalkine/CX3CR1 impliquant de TLR4 et signalisation dépendante de la Gi lprotéine

III.1. La résistine module l'expression CX3CL1/CX3CR1 dans les cellules musculaires lisses dépendant des facteurs de transcription de NF-kB, AP-1 et STAT

a. Introduction et objectifs
b. Matériaux et méthodes
c. Résultats
d. Discussion et conclusions

III.2. Modulation de l'expression des suppresseurs de cytokines de signalisation (SOCS) induite par la résistine dans les cellules musculaires lisses

a. Introduction et objectifs
b. Matériaux et méthodes
c. Résultats
d. Discussion et conclusions

IV. Étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de fractalkine l'expression associés athérogènes process

IV.1. *In silco* analyse et clonage du promoteur de fractalkine gènes; des transcription facteurs impliqués dans la régulation du promoteur de fractalkine

a. Introduction et objectifs
b. Matériaux et méthodes
c. Résultats
d. Discussion et conclusions

Conclusions générales
Résumé
Bibliographie
Liste des travaux publiés
Liste des documents présentés lors de réunions scientifiques
Subventions

Mots-clés: les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, l'inflammation, les inflammatoires marqueurs, des cytokines, des chimiokines, le diabète, la résistine, fractalkine, MCP-1, l'homme cellules musculaires lisses vasculaires, les monocytes, la communication intercellulaire, les MAPK kinases, des inflammatoire transcription facteurs, de promoteur.

Les maladies cardiovasculaires avec l'allié principal, le dysfonctionnement métabolique, est le principal problème socio-sanitaire dans les pays développés. Le nombre de patients atteints de maladies cardiovasculaires est en augmentation, ce qui implique de mieux algorithme pronostique maintenant en identifiant les facteurs de risque liés à l'état moléculaire des maladies et l'élucidation des mécanismes cellulaires et moléculaires qui leur sont associées, ainsi que l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques. Facteurs de risque traditionnels impliqués dans des pathologies cardiovasculaires développer le diabète, l'hyperlipidémie, l'obésité, l'hypertension et, plus récemment, les processus inflammatoires ont également été associés.

Processus pathologique fondamentale et la principale cause de maladies cardiovasculaires est **l'athérosclérose**. L'athérosclérose est une maladie multifactorielle dont la pathogénie est encore mal compris, mais complexe inflammation cellulaire et de ses processus jouent un rôle important dans la progression de la lésion. L'athérosclérose implique des interactions complexes entre les cellules inflammatoires (neutrophiles, lymphocytes, monocytes/macrophages) et les cellules vasculaires (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses). L'inflammation est un facteur de risque indépendant d'athérosclérose, mais les mécanismes impliqués sont encore inconnus.

Immuno-inflammatoires mécanismes sont directement impliqués dans l'initiation et la progression de la maladie cardiovasculaire (CV) de asimtomatic premiers stades de la *lésion vasculaire*, les manifestations cliniques *de dysfonctionnement* et *le remodelage vasculaire*. Parce que la lésion vasculaire est en partie réversible identification phénotype inflammatoire est indispensable pour supprimer les processus inflammatoires et dans de nouvelles stratégies thérapeutiques. Processus inflammatoire de la lésion athéroscléreuse implique la participation des *effecteurs moléculaires* (récepteurs de reconnaissance de motifs " pattern recognition", inflammatoires molécules bioactives) et des effecteurs cellulaires (monocytes/macrophages, les lymphocytes, les cellules présentatrices de l'antigène et les cellules dendritiques). En outre, les médiateurs impliqués dans la modulation des processus inflammatoires peuvent être ***des marqueurs de processus inflammatoires vasculaires*** et cibles thérapeutiques potentielles. Les technologies de pointe de la protéomique, la métabolomique et la génétique sont les suivants: i) l'identification de biomarqueurs présumés ou facteurs de risque, ii) élaborer des cibles thérapeutiques, iii) enrichis précédemment développées des thérapies efficaces, de sorte que certains biomarqueurs sont la

norme expérimentale, en étroite corrélation avec leur statut maladie. Mise en évidence des mécanismes spécifiques de signalisation moléculaires impliqués dans l'expression et l'action de ces marqueurs dans les cellules paroi vasculaire n'ont pas encore été élucidés.

Dans une tentative d'apporter de nouvelles données pour aider à déchiffrer les mécanismes associés athérosclérose inflammatoire, ce document vise à identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de la réponse inflammatoire des cellules de la paroi vasculaire. Identification des mécanismes moléculaires inflammatoires est nécessaire pour «screening» des patients atteints de maladie cardiovasculaire précoce dans le suivi de traitement anti-inflammatoire par la quantification de biomarqueurs de l'inflammation, mais aussi dans le développement de thérapies ciblées.

Dans la première partie de la thèse "L'état actuel de la connaissance», sont présentées à travers différents chapitres quatre caractéristiques du processus inflammatoire associé pathologie cardiovasculaire.

Le chapitre I décrit les mécanismes associés inflammatoire athérogenèse effecteurs et le rôle de l'immunité innée et adaptative du système immunitaire dans le processus inflammatoire. Mécanismes immunitaires innées ont un rôle central dans l'athérosclérose en activant les récepteurs „pattern-recognition" (PRR) qui favorise la réponse inflammatoire. En réponse PRR liaison et d'activation *d'effecteurs immunitaires innée* sont libérés *peptide* (CRP, système du complément), de *l'oxyde nitrique* (NO), *eicosanoides* (prostaglandines et leucotriènes) et des *molécules inflammatoires* (cytokines, chimiokines). En outre, de nombreuses études montrent le rôle important de la réponse ***de l'antigène spécifique*** dans l'athérosclérose modulée par des effecteurs de l'immunité adaptative. Ainsi, le système immunitaire adaptatif peuvent influencer les processus athérogènes de trois manières différentes: i) *interaction de cellule à cellule* entre les cellules présentatrices de l'antigène, les macrophages, les ganglions lymphatiques B ou T et CD, ii) *la libération de cytokines* par actif lymphatique médiateur activation des macrophages et T autres plaque cellules iii) *sécrétion d'anticorps* par la lymphe B dépendant/indépendant de la lymphe T.

Chapitre II montre le rôle des cytokines dans l'inflammation vasculaire et la modulation des mécanismes de signalisation induits par les cytokines pro-inflammatoires. Des niveaux élevés de cytokines inflammatoires conserver leur statut associé dysfonction vasculaire dans les maladies comme l'athérosclérose, l'hypertension, anévrisme de l'aorte abdominale et les varices. Les effets biologiques des cytokines pro-inflammatoires TNF-α, IL-1 et IL-6 se reflète dans les mécanismes inflammatoires associés à l'athérosclérose.

Le chapitre III décrit **chimiokines** en tant que médiateurs dans des cellules vasculaires leucocytes interaction. Les chimiokines sont modulées pour différentes sous-populations de leucocytes chemoatractanti mais aussi les cellules nonhematopoetice (CMN) en réponse à des stimuli d'activation. Chimiokines et récepteurs de chimiokines comprennent un complexe qui

attirent des sous-ensembles spécifiques de leucocytes dans chaque étape du processus athérogène. Recrutement de sous-ensembles de leucocytes implique diverses chimiokines inflammatoires engagés dans les heterofile interactions favorisé des protéoglycanes. Des études récentes ont montré que les taux circulants de chimiokines peut être associée à diverses maladies inflammatoires et les maladies coronariennes et **MCP-1** est un facteur pronostique indépendant dans le syndrome coronarien aigu. L'inflammation vasculaire peut être modulée par l'axe chimiokine/récepteur ***MCP-1*** (CCL2)/***CCR2*** et des stratégies telles que la thérapie génique (gène mutant de délétion MCP-1) ou le ciblage pharmacologique réduit la réponse inflammatoire ainsi MCP-1 peut être à la fois **marqueur pronostique** et **cible thérapeutique**. Axe CX3CL1/CX3CR1 peuvent également être impliqués dans le dialogue entre les cellules vasculaires, des globules blancs, des études immunohistochimiques ont confirmé la présence d'athérosclérose axe plaque CX3L1/CX3CR1 la coronaire (monocytes / macrophages, CE, CMN). Les cellules musculaires lisses (CMN) de la plaque d'athérosclérose néointima CX3CR1 express qui démontre que les multinationales migrent vers les médias en raison de CX3CR1, gradient CX3CL1-dépendante de intime. CX3L1/CX3CR1 médiateur axes d'ancrage des monocytes/macrophages dans la CMN plaque qui prend en charge thérapeutique capacité de ciblage de ces voies pro-inflammatoires dans les maladies cardiovasculaires. En conclusion, *le axe Fk/CX3CR1* peut être considéré comme la cible la plus prometteuse pour l'intervention thérapeutique pro-inflammatoire dans l'athérosclérose. Mécanismes de signalisation intracellulaire doivent être bien comprises afin de développer une nouvelle classe d'agents anti-inflammatoires.

Chapitre IV-montre diabète comme facteur de risque cardiovasculaire majeur associé de façon indépendante les processus complications athéroscléreuses micro/macro-vasculaires s'accélère. Le diabète et l'athérosclérose sont multifactorielles conditions qui semblent avoir une base commune inflammatoire parce que les deux maladies sont libérés des *marqueurs inflammatoire de la phase aiguë* (CRP, IL-6 acide sialique, l'amyloïde A, cortisone) spécifique l'immunité innée. Pro-athérogènes mécanismes associés à l'hyperglycémie dans les cellules de la paroi vasculaire sont décrits en détail dans ce chapitre.

En essayant de déchiffrer les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'inflammation associées aux processus d'athérosclérose, et de développer une stratégie thérapeutique visant à réduire ce processus joue un rôle important dans l'initiation ultérieure maladies cardio-vasculaires, ce document met l'accent vertu de la partie II la phrase «contributions originales» sur les principaux objectifs suivants:

I. Le rôle de la concentration de glucose élevé dans les cellules musculaires lisses aggraver l'inflammation; l'effet des fibrates (PPAR-α activateurs) dans la modulation de l'expression et la fonction des chimiokines (MCP-1 et fractalkine)

II. Soulignant voies de signalisation cellulaire qui régule l'expression chimiokines MCP-1 et fractalkine dans les cellules musculaires lisses

III. Etude de l'interaction entre les cellules musculaires lisses et des monocytes dans la modulation d'expression des molécules pro-athérogènes; soulignant le rôle des CX3CL1-CX3CR1 axe dans la médiation des interactions cellulaires

IV. Signalisation impliquées dans de l'interaction CMN-les monocytes dépendante de axe CX3CL1/CX3CR1

V. Le rôle de la résistine dans la modulation phénotype des cellules musculaires lisses; les mécanismes moléculaires impliqués dans l'action de la résistine sur cellules musculaires lisses vasculaires.

VI. Caractérisation de fonctionnel fractalkine promoteur

Dans le **chapitre I**, nous avons inclus des études effets les de la concentration de glucose élevé dans la modulation de l'expression de MCP-1 et fractalkine sur les cellules musculaires lisses et le rôle fonctionnel de ces chimiokines, l'adhérence des monocytes et des savoir chimiotactisme des cellules activées par l'hyperglycémie. En outre, j'ai observé l'effet de PPAR activateurs (fénofibrate et le clofibrate) sur fractalkine expression et de MCP-1 dans les cellules musculaires lisses exposées à la concentration de glucose élevé, mais aussi des mécanismes de signalisation impliqués dans l'action du glucose élevé dans ces cellules.

Les résultats de cette étude ont montré que le glucose élevé induit l'expression nivelelul fractalkine et MCP-1 dans les cellules musculaires lisses directement proportionnelle à la concentration en glucose. Les résultats confirment des études antérieures qui ont identifié cette fractalkine dans les vaisseaux intimes. De plus, les activateurs de PPAR-α, le **fénofibrate** et **clofibrate** réduit également l'expression des gènes et des protéines de MCP-1 et fractalkine dans CMN activée par l'hyperglycémie. Effet du glucose sur le niveau de chimiokines MCP-1 et fractalkine fonctionnelle se traduit par l'augmentation du nombre de monocytes adhérant à CMN. L'adhérence des monocytes sur CMN activés par glucose est dépendant des ces chimiokines, comme l'inhibition de la signalisation avec *la toxine de pertussis* réduit le nombre de monocytes adhérant. En particulier, le rôle de MCP-1 et fractlkine est soulignée par des expériences dans lesquelles des récepteurs de chimiokines ont été bloqués (par incubation avec des anticorps spécifiques), ce qui conduit à une diminution du nombre de monocytes adhèrent.

Mécanisme de signalisation impliquées dans la surexpression de MCP-1 et fractalkine par le glucose élevée induite activation des protéines kinases ERK1/ 2, p38MAPK et des transcription facteurs de NF-kB et AP-1-dépendantes des espèces oxygénées réactives libérées (ROS). L'inhibition des espèces réactives de l'oxygène avec PDTC et DPI réduit l'activation de ERK1 /2 et p38 MAPK suggérant l'implication du stress oxydatif dans l'activation de la MAPK. Également inhiber les kinases p38MAPK et ERK1/2 inhibiteur spécifique (SB203580 ou PD98095) réduit

complètement la phosphorylation de ***c-jun*** et ***IkBα*** suggérant le rôle des p42/44MAPK et p38MAPK dans l'activation NF-kB respectivement AP-1. En outre, nous avons étudié le rôle de NF-kB et AP-1 dans MCP-1 et fractalkine expression par de la transfection avec oligodeoxinucleotide concurrence pour les NF-kB et AP-1. Le blocage sites de liaison des NF-kB et AP-1 réduit l'expression des protéines de MCP-1 et fractalkine, suggérant l'implication de transcription facteurs dans la modulation des deux chimiokines. Clofibrate et fénofibrate réduit la phosphorylation/activation des p38MAPK et ERK1/2 kinases, de sorte que soit empêché la translocation des transcription facteurs de NF-kB et AP-1 la libération ou MCP-1 et fractalkine.

En conclusion, les études dans ce chapitre montrent que l'activation de la CMN vasculaire par la supraexpression de ces chimiokines, induit une augmentation des interactions adhésives entre les monocytes et CMN, les études peut expliquer l'un des mécanismes induits athérosclérose accélérée dans des conditions diabétiques.

Dans le **chapitre II**, nous avons étudié le rôle ***CX3CL1/CX3CR1*** axe dans le dialogue entre les cellules musculaires lisses et les monocytes, mais cette implication voie dans l'expression excessive de molécules pro-inflammatoires, études antérieures prouvent cette fractalkine et récepteur dans la plaque d'athérome coronaire. Ainsi, nous avons supposé que l'interaction entre les CMN et les monocytes peut être réalisé par *fractalkine-CX3CR1* qui peut influer sur chaque type de cellule en modulant les molécules inflammatoires avec rôle importante dans progression de l'athérosclérose plaque.

Les résultats montrent que démonstre l'interaction entre les CMN et les monocytes ou entreprises avec les CMN et les les monocytes activés par le LPS (lipopolysaccharide) augmentation de l'expression de molécules de TNF-α, IL-1β, IL-6, CX3CR1 et MMP-2, -9 dans les deux types de cellules et activer supplémentaire expression de monocytes avec LPS exacerbe TNF-α, CX3CR1 et MMP-9. Modulation de l'expression du TNF-α, CX3CR1 et MMP-9 est dependent de la fractalkine-CX3CR1 axe tandis que l'expression de l'IL-6, IL-1β et MMP-2 est indépendant du récepteur-ligand à cette paire. Interaction des CMN-monocytes activation p38MAPK kinase qui successives transduction de transcription facteurs NF-kB et AP-1 qui facilite encore la production de molécules pro-athérogènes (cytokines et MMP). La communication entre les entreprises CMN et monocytes par liaison à fractalkine ou recepteur est dépendante transduction de ***AP- 1*** transcription facteur de impliqué dans la régulation de l'expression des molécules pro-athérogène TNF-α, et MMP9 CX3CR1.

Les données de cette étude étendre le rôle connu de fractalkine et son récepteur suggèrent que la plaque d'athérome, une communication directe entre les cellules musculaires lisses et les monocytes amplifier la réponse inflammatoire en *fractalkine-CX3CR1 axe* qui fonctionnent comme des molécules essentielles induire la progression de l'athérome. Ainsi, CX3CL1-CX3CR1 paire peut

être une nouvelle cible thérapeutique pour réduire le processus inflammatoire associé à l'athérosclérose.

Dans **le chapitre III**, nous avons regardé inflammatoire effecte de la résistine dans les cellules musculaires lisses en modulant l'expression du fractalkine et CX3CR1 dépendante du TLR4 récepteur.

Le but de cette étude était d'examiner le rôle de la résistine comme un modulateur de la CMN phénotype respectivement, effets pro-inflammatoires exercée. Depuis la résistine et fractalkine sont présents dans les lésions athéroscléreuses et CX3CR1 récepteur est principalement associée aux CMN, nous avons supposé que la résistine peut être inducteur de fractalkine (CX3CL1) et de contribuer de cette manière à la fois phénotype modulation (pro-inflammatoire) à CMN et le augmenté la transmigration des monocytes.

Les résultats montrent que la résistine peut induire l'expression significative de CX3CL1 et CX3CR1 dans CMN vasculaire qui démontre que la résistine peut être une cytokine operatioanelle dans l'induction de l'état pro-inflammatoire et contribuer au développement de l'athérosclérose. Depuis récepteur de la résistine dans les cellules vasculaires ne sait pas encore démontrent, les résultats expérimentaux de cette étude les anti-TLR4 et PTX inhibe CX3CL1 et CX3CR1 expression induite par la résistine, ce qui suggère la résistine peut utiliser les deux récepteurs TLR4 et les récepteurs Gi-protéines dans la modulation de ces molécules.

En outre, les résultats de cette étude montrent que la résistine active p38MAPK et STAT3 mais pas ERK1/2. Des inhibiteurs pharmacologiques de p38MAPK réduite significativement CX3CL1 et CX3CR1 expression dans CMN activé avec la résistine. Activation p38MAPK par résistine peut induire une translocation des sous-unités p65 et c-Jun des transcription facteurs impliqués dans la production de NF-kB et AP-1. De plus, l'inhibiteur de *SP100030* (double inhibiteur de NF-kB et AP-1) réduit fractalkine et CX3CR1, ce qui démontre le rôle de NF-kB et AP-1 dans leur réglementation. Ensemble, ces résultats indiquent que le NF-kB et AP-1 sont impliqués dans l'expression de la fractalkine et récepteur spécifique dans la CMN vasculaire. Les résultats montrent également que le blocage de la voie JAK/STAT inhibiteur spécifique *WP-1066*, mais silentierea STAT1/STAT3 avec ODN spécifique, réduite de CX3CL1 et son récepteur, ce qui démontre que les facteurs de transcription STAT sont impliqués dans ce processus de plus de l'action de NF-kB et AP-1.

Expériences de chimiotaxie effectué avec système xCELLigence démontre que la fractalkine induite de la résistine est fonctionnel par la transmigration des monocytes. Le milieu conditionné recueilli de CMN activé avec résistine donne un signal chemoatractant fort pour les monocytes. Addition d'anti-CX3CL1 dans le milieu conditionné de CMN activé avec résistine diminue de façon significative le nombre de monocytes transmigré. Tous ces résultats montrent que l'effet

chimiotactique des fractalkine soluble libérée dans le conditionnement est dépendante de l'expression/interactions avec le récepteur CX3CR1 sur les monocytes.

Dans le **chapitre IV**, nous avons conçu des expériences pour révéler si l'activité du CX3CL1promoteur et l'expression est régulée par des mécanismes de transcription facteurs directe/indirecte NF-kB, AP-1 et STAT1/STAT3.

Les analyses *in silico* de **l'homme CX3CL1 promoteur** à indiquer l'existence éléments promoteurs spécifiques le *CCAC* et *TATA* boîte. En outre, nous avons identifié les sites de liaison relatives à la physiologie vasculaire et la pathologie dont NF-kB, AP-1, GAS (STAT1/STAT3), C / EBP, GATA et GAGA. L'analyse des mutants de délétion a CX3CL1 montrent que NF-kB, AP-1 et STAT1/STAT3 ne sont pas essentielle du promoteur activité dans les CMN, mais rôle dans la modulation de la réponse à des stimuli inflammatoires. Pour étudier les éléments fonctionnels NF-kB, AP-1 et GAS, nous avons analysé l'activité de facteurs de transcription nucléaires par la technique ChIP dans des CMN traités avec la résistine. Les résultats montrent que les séquences dans l'analyse in silico fournie par le correspondant d'AP-1, NF-kB et GAS complexe de liaison formé avec c-Jun, p65 et STAT1/STAT3. Les résultats montrent de nombreux *non-canoniques* interactions entre les protéines p65/NF-kB, c-Jun/AP-1 et STAT1/STAT3.

En conclusion, ces résultats montrent pour la caractérisation promoteur CX3CL1 l'homme temps premier. Les résultats démontrent que les interactions complexes entre NF-kB, AP-1 ou STAT1 / 3 et les voies associées réglementer directement/indirectement CX3CL1, qui peut être responsable de CX3CL1 surexpression de la plaque d'athérome humain. Ces facteurs de transcription sont essentiels pour modulation de nombreux transducteurs des facteurs de risque cardiovasculaire et les organismes de réglementation „up-strem" de la CX3CL1 promoteur peut représenter une stratégie pharmacologique efficace pour soulager la forte pro-inflammatoire de CX3CL1.

L'ensemble de ces résultats obtenus dans les "contributions originales" souligne l'importance des interactions complexes entre des facteurs de transcription, coactivateur, et/ou corepresori dans surexpression fractalkine. Inhibition chimique des voies des kinases „up-strem" (p38MAPK, JNK et JAK2) et la suppression des facteurs de transcription NF-kB, AP-1 et STAT1/3 par ARN interférence technologie réduit fractalkine l'expression induite depndent de la résistine et du glucose augmenté. Tous ces résultats montrent l'importance des voies de signalisation **NF-kB**, **AP-1** et **STAT1/3** dans la régulation de l'expression de CX3CL1, ce qui explique sa présence dans les lésions athéroscléreuses de l'homme dépend de l'expression de la résistine sécrétée par les macrophages ou des lésions de l'hyperglycémie diabétique.

Comme il s'agit d'une thèse prédominante objectif fondamentalement ultime de ces études est la nature de la demande. Série d'expériences peut aider à élucider les mécanismes de la plaque

d'athérosclérose inflammatoire, à savoir l'optimisation des thérapies dynamiques pour réduire les processus inflammatoires.

Nombre de figures au première partie - 27

Nombre de figures originales (deuxième partie) - 34

Références des indications - 373

Articles publiés dans des revues internationales ISI - 9

Articles publiés dans des revues nationales CNCSIS - 1

Les présentations orales à des conférences scientifiques internationales - 2

Les résumés des communications présentées lors de réunions scientifiques internationales - 30

Les résumés des communications présentées lors de réunions scientifiques nationales - 4

Formations et cours menées - 5

Participation à des projets de recherche - 4 nationale, 2 international

The Gender Equality Strategy and the Gender Equality Plan of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"

2022-2025

January 2022

Contents

Introduction 4

I. Review of requirements, policies and case studies 4

II. Diagnosis (data collection and analysis) 5

II.1. Data collection 5

II. 2. Data analysis 8

III. GE strategy and GEP 10

III.1. GE Strategy 2022-2025 10

III.2. GE Plan 2022-2025 11

IV. Monitoring and evaluation of the GEP 18

Annex 1. Horizon Europe recommended methodology and areas of intervention for the gender equality plan 19

I. Elemente cheie 19

II. Metodologia de înființare a unui GEP în organizația de cercetare 21

1. Resurse dedicate 21

2. Implicarea întregii organizații 21

Annex 2. Horizon Europe recommended indicators for data collection and analysis 25

Annex 3. List of sources used for the literature review 26

Abbreviations and definitions

GE	Gender equality
GEP	Gender equality plan
HoD	Head of Department
HR	Human Resources
GD	General Director
SD	Scientific Director
CD	Steering Committee
CA	Board of Directors
Sex	Either of the two major forms of individuals that occur in many species and that are distinguished respectively as female or male, especially based on their reproductive organs and structures (https://www.merriam-webster.com/dictionary/)
Gender	The behavioral, cultural, or psychological traits typically associated with one sex (https://www.merriam-webster.com/dictionary/)
Sex vs Gender	A clear delineation between sex and gender is typically prescribed, with sex as the preferred term for biological forms, and gender limited to its meanings involving behavioral, cultural, and psychological traits. In this dichotomy, the terms male and female relate only to biological forms (sex), while the terms masculine/masculinity, feminine/femininity, woman/girl, and man/boy relate only to psychological and sociocultural traits (gender) (https://www.merriam-webster.com/dictionary/)

Introduction

The Gender Equality (GE) strategy for 2022-2025 was developed by the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" based on input from the entire research group and taking into account everyone who works at our research institute. The GE strategy was built on the provisions of the European Charter for researchers and of the Code of Conduct in the process of the recruitment of researchers[1], 2015-2019, the European Gender Equality Strategy 2020-2025[2] , and the Horizon Europe guidance on gender equality plans[3].

The motivation for developing the GE strategy is to ensure that our research institute is a safe place for everyone and that all activities and processes that take place respect the principles of equality, diversity, inclusiveness, and non-discrimination. Based on the GE strategy, the research institute developed the GE Plan (GEP) for 2022-2025, with concrete actions and measures, as well as indicators for measuring the progress of its implementation and revisions.

Enforcing its mission and values, the GE strategy and the GEP of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" ensure and promote equality and diversity in knowledge and the acquisition of skills to all. The objectives of the GE strategy are implemented through specific actions that aim at safeguarding an equal and inclusive organizational culture and promoting gender equality at all levels. As such, the GE strategy and the GEP will proactively enable, gender equality awareness raising, skills, and competencies; gender balance in decision-making structures and processes, including recruitment; gender equality in research; and integration of the gender dimension in the entire research process.

I. Review of requirements, policies, and case studies

Before developing the GE strategy and the GEP, the management of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" appointed a working group to conduct a literature review of the existing requirements, policies, recommendations, examples, and case studies pertinent to discrimination, inclusiveness, and gender equality, with a special focus on research performing organizations (RPOs).

The resources used in this literature review study are presented in Annex 3.

[1] https://cdn2.euraxess.org/sites/default/files/policy_library/ttf_goal_2_results_v1.0.pdf
[2] https://ec.europa.eu/info/policies/justice-and-fundamental-rights/gender-equality/gender-equality-strategy_en
[3] https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ffcb06c3-200a-11ec-bd8e-01aa75ed71a1

II. Diagnosis (data collection and analysis)

II.1. Data collection

The following indicators were selected at the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" as relevant for the discussion on gender equality issues:

- Staff numbers by sex/gender at all levels, by domains, function (including administrative / support staff)
- Numbers of women and men in research and administrative decision-making positions (e.g., top management team, boards, committees, recruitment, and promotion panels);
- Numbers of staff by sex/gender applying for/taking parental leave, for how long, and how many returned after taking the leave.

1. Women and men in leadership positions

Table 1. Research institute management

	Woman	**Man**
President of the Board of Directors	Acad., Dir gr. II	
General Director	Acad., Dir gr. II	
Scientific Director	CS I	
President of the Scientific Committee	CS I	
Economic Director	Chief account	
Head of Department 1 - Proteomics	CS I	
Head of Department 2 - Lipidomics	CS I	
Head of Department 3 - Pathophysiology and Pharmacology	CS I	
Head of Department 4 – Bio-pathology and Inflammation Therapy	CS I	
Head of Medical and Pharmaceutical Bionanotechnologies Laboratory	CS I	
Head of Biopathology and Inflammation Therapy Laboratory	CS I	
Head of Inflammation Laboratory	CS I	
Head of Gene Regulation and Molecular Therapies Laboratory	CS I	
Head of Molecular and Cellular Pharmacology - Functional Genomics Laboratory		CS I

Head of Stem cell biology Laboratory	CS I	
Head of Cellular and Tissue Engineering Laboratory	CS II	
Head of Conventional Animal Models Laboratory		Vet Doctor
Head of SPF Animal Models Laboratory	CS III	
Head of Technical Service		Ing.
TOTAL	**16**	**3**

Table 2. Coordinators of other departments not directly involved in research:

	Woman	**Man**
Economic department	1	
HR	1	
Technical department		1
Acquisitions department		1
TOTAL	**2**	**2**

2. Women and men – research staff

Table 3. Total number of research staff, per department

	Experienced researchers (CS I, CS II, CS III)	**Early-stage researchers (CS and ACS)**	**Total women**	**Total men**
1. Proteomics	Total Number Women - 4	Total Number Women-1	5	2
	Total Number Men - 2	Total Number Men - 0		
2. Lipidomics	Total Number Women - 5	Total Number Women- 1	6	1
	Total Number Men - 1	Total Number Men - 0		
3. Pathophysiology and Pharmacology	Total Number Women - 5	Total Number Women - 1	6	0
	Total Number Men - 0	Total Number Men - 0		
4. Bio-pathology and Inflammation Therapy	Total Number Women - 1	Total Number Women	1	0
	Total Number Men	Total Number Men		
	Total Number Women - 4	Total Number Women - 4	8	0

5. Medical and Pharmaceutical Bionanotechnologies Laboratory	Total Number Men - 0	Total Number Men - 0		
6. Inflammation Laboratory	Total Number Women - 3	Total Number Women - 3	6	2
	Total Number Men - 0	Total Number Men - 2		
7. Gene Regulation and Molecular Therapies Laboratory	Total Number Women - 6	Total Number Women - 4	10	2
	Total Number Men - 1	Total Number Men - 1		
8. Molecular and Cellular Pharmacology - Functional Genomics Laboratory	Total Number Women - 0	Total Number Women - 3	3	1
	Total Number Men - 1	Total Number Men - 0		
9. Stem cell biology Laboratory	Total Number Women - 1	Total Number Women - 3	4	2
	Total Number Men - 1	Total Number Men - 1		
10. Cellular and Tissue Engineering Laboratory	Total Number Women - 2	Total Number Women - 2	4	1
	Total Number Men - 0	Total Number Men - 1		
11. Conventional Animal Model Laboratory	Total Number Women - 0	Total Number Women - 0	0	1
	Total Number Men - 0	Total Number Men - 1		
Total women			**53**	
Total men				**12**

3. Women and men – administrative and support services

Table 4. Total number of women and men in administrative and support services

	Women	**Men**
Financial - accounting	Total number - 4	Total number - 0
Office administration support (secretaries)	Total number - 1	Total number - 0
H.R.	Total number - 1	Total number - 0
Shed	Total number - 1	Total number - 0
Librarians	Total number - 1	Total number - 0
Building administration	Total number - 0	Total number - 5
Auxiliary staff	Total number - 3	Total number - 0
Acquisitions	Total number - 1	Total number - 1
Security and protection	Total number - 0	Total number - 7
TOTAL	**12**	**13**

As part of data collection and diagnosis, we conducted institute-wide surveys with the following indicators:

- Number of years needed for women and men to make career advancements
- Numbers of women and men candidates applying for distinct job positions
- Numbers of staff by sex/gender applying for/taking parental leave, for how long, and how many returned after taking the leave
- Opinions on the work-life balance in the research institute
- Integration of the gender dimension into research content
- Perception of gender-based violence, including sexual harassment in the research institute
- Perception (opinion) regarding inclusiveness and discrimination at the institute

II. 2. Data analysis

We conducted internal analyses of the data collected, and reviews of existing policies addressing gender equality and inclusiveness. The analyses took place in workshops, meetings, and working seminars at all levels, with the gender equality function assigned for developing the GEP and including the research institute management, research staff, and representatives of the research institute administrative and support services. Each and all working groups included almost even numbers of men and women.

The conclusions of the internal audit were then analyzed by the Steering Committee, approved by the Scientific Council, and then communicated to the entire research institute staff.

With a mandate from the Scientific Council, the General Director committed to the development and implementation of the GEP for the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", for 2022-2025.

1. Quantitative analysis of data

The analysis of numerical data illustrated that:

- There are more women than men in leadership positions at the department level
- The number of women and men in research positions, i.e., experienced researchers and early-stage researchers, is good, reflecting good existing recruitment practices in the institute

2. Qualitative analysis of data

The qualitative research showed that:

- The Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" is a safe place, without gender-violence
- The research institute is overall perceived as inclusive
- Due to the lower salaries in research than in clinics, private and industry in Romania, less man remains to work for a long term in the research institute. That is why there are more women than men involved in research.
- The women are well integrated into the research activities. However, in general, combining work and family life – women more often declare that they are responsible for most of the family duties. Women do more housework and have maternal responsibilities. Thus, the expectation of long international mobility is more difficult for women to reconcile with taking care of children and other dependents. However, in our institute, the women with children are well integrated and are involved in scientific and social life.
- Respondents to surveys indicated that they did not experience comments or jokes referring to stereotypical beliefs about gender, inappropriate informal attitudes, derisive comments about dress and appearance, or questions about the ability to combine professional work with caring for children.
- No respondents to surveys indicated inappropriate violations of personal space, persistent attempts at initiating contact about private matters, and sexual advances.

To summarize the results of these studies, revealed that in all the situations mentioned by the respondents and analyzed in our academic research institute - there are no factors of discrimination or manifestations based on gender.

The important conclusions of the internal analysis at the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" are:

- our existing policies and procedures are relevant, starting from the appointment procedures that do not discriminate the gender.

- our staff is educated on gender equality

- we will continue to communicate gender-relevant actions and measures actively and efficiently

- a responsible person for our gender strategy and a GEP for 2022-2025 will be designated

III. GE strategy and GEP

Based on the internal review and the national and European policies and requirements, the Scientific Council and the General Director committed to developing the institute strategy for gender equality for 2022-2025, and the corresponding GEP.

The Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" decided on creating the function of GE officer at the institute plus one GE delegate in each department. The GE officer has a proactive role, and the GE delegates have a consultant role in implementing and monitoring the GE strategy.

Specifically, the GE officer and GE delegates contribute to setting up, implementing, monitoring, and evaluating the GEP; provide practical support and tools to the actors involved in the GEP implementation; cooperate with and engage stakeholders at all levels to ensure the implementation of the GEP's actions; raise awareness about the benefits of gender equality in the research institute; assess the progress towards gender equality in the institute.

The institute management mandated the GE functions (officer and delegates) as a dedicated working group to develop the GE strategy and the GEP 2022-2025. The GE working group included men and women representatives of research institute leadership and researchers, representatives of research institute administration and support services, and one external advisor (from UEFISCDI, and the Romanian Academy).

III.1. GE Strategy 2022-2025

The GE Strategy comprises the following areas of intervention and objectives for 2022-2025:

Area of intervention	Objective(s)
1. Work-life balance and organizational culture	Promoting integration of work with family and personal life
2. Gender balance in leadership and decision-making	Promoting gender equality in the institutional culture, processes, and practice
3. Gender equality in recruitment and career progression	Promoting processes to favor and support gender-sensitive recruitment, career and appointments
4. Integration of the gender dimension into research content	Promoting a gender and sex perspective in the research process

	Promoting the integration of a sex and gender perspective in research activity
5. Measures against gender-based violence, including sexual harassment	Raising awareness about the importance of equality issues and strengthening positive attitudes towards diversity

III.2. GE Plan 2022-2025

The GE Plan at the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" comprises areas of intervention, objectives, key measures, target audience, timeline, responsible persons, and indicators to measure progress.

Area 1. Work-life balance and organisational culture

Objective: Promoting integration of work with family and personal life

Action/Measure	Target	Timeline				Indicator(s)	Responsible
		2022	2023	2024	2025		
1. Availability of policies, procedures, and structures at the research institute for promoting the integration of work with family and personal life	Researchers, technical and administrative staff		X	X	X	Policies, procedures, and services for work and personal life integration	GD, HR, HoDs, GE officer
2. Feasibility plans for the creation of new welfare services, e.g., contract arrangements made by the research institute with service suppliers from family care duties and house chores to child-care (elderly-care) in case of conference or congress, or international mobility	Researchers, technical and administrative staff		X	X	X	Policies, procedures, and services for work and personal life integration	GD, HR, HoDs, GE officer
3. Implementation of ICT-based systems for enhancing flexibility and improving better planning of working meetings accordingly to work-life balance needs (e.g., management and communications of the meeting schedule/timing)	Researchers, technical and administrative staff	X	X	X	X	Standard procedure for ICT-based systems promoting work and personal life integration	GD, HR, HoDs, GE officer, IT services
4. Availability of flexible working times arrangements, from part-time to remote working	Researchers, technical and administrative staff	X	X	X	X	Policies, procedures, and services for work and personal life integration	GD, HR, HoDs, GE officer

Area 2. Gender balance in leadership and decision-making

Objective: Promoting gender equality in the institutional culture, processes, and practice

Action/Measure	Target	Timeline				Indicator(s)	Responsible
		2022	2023	2024	2025		
1. Appointing delegates in departments, with a proactive and/or consultant role to be responsible for monitoring and ensuring that workplace procedures and practices respect gender equality	Researchers, technical and administrative staff	X	X			Gender equality policy and structures	GD, HR, HoDs, GE officer, GE delegates
2. Routine revision of any text, communication, or images, from gender equality and diversity standing point	Researchers, technical and administrative staff	X	X	X	X	Policies, procedures, and services for work and personal life integration	GE officer, GE delegates
3. Promotion of initiatives to facilitate widespread gender competence at all levels of the organization with the provision of training to staff and researchers	Researchers, technical and administrative staff	X	X	X	X	Awareness training on gender equality issues	GE officer, GE delegates

Area 3. Gender equality in recruitment and career progression

Objective: Promoting processes that facilitate and support gender-sensitive recruitment, career, and appointments

Action/Measure	Target	Timeline				Indicator(s)	Responsible
		2022	2023	2024	2025		
1. Carrying out gender awareness initiatives, briefings, and creating guidelines for gender-sensitive recruitment, career, and appointments	Research institute management	X	X	X	X	Gender awareness initiatives and guidelines	GD, HR, HoDs, GE officer
2. Training and dialogs on gender equality	Researchers, technical and administrative staff	X	X	X	X	Courses and training for recruitment Courses and training for career progression Courses and training for leadership	GD, HR, HoDs, GE officer, GE delegates
3. Disseminate and communicate career good practices - role models for women (scientists, researchers, and academics)	Researchers, technical and administrative staff		X	X	X	Initiatives for raising awareness of female role models Initiatives for raising awareness on gender diversity in research teams	GE officer, GE delegates, HoDs

Area 4. Integration of the gender dimension into research content

Objectives:

- Promoting a gender and sex perspective in research process

- Promoting the integration of a sex and gender perspective in research activity

Action/Measure	Target	Timeline				Indicator(s)	Responsible
		2022	2023	2024	2025		
1. Internal training seminars on sex and gender perspectives in research, to foster the acknowledgment of its economic, social and innovation value	Researchers, scientific community	X	X	X	X	Participation in training seminars on integrating sex/gender analysis methods, by gender and field of research	SD, Researchers, GE officer
2. Development, communication and implementation of standards for the incorporation of sex and gender variables into research	Researchers		X	X	X	Participation in training seminars on integrating sex/gender analysis methods, by gender and field of research Perception of the gender/sex variables in research contents	SD, Researchers, GE officer

3. Institutional recognition of those projects that have taken the gender dimension into account. (e.g., prizes)	Researchers, the scientific community		X	X	X	Awarded projects	GD, HoDs, Researchers
4. Disseminate and communicate career good practices - role models for women (scientists, researchers, and academics)	Researchers, technical and administrative staff		X	X	X	Initiatives for raising awareness of female role models Initiatives for raising awareness on gender diversity in research teams	GE officer, GE delegates, HoDs
5. Workshops on the integration of gender equality and diversity issues in research activity, as support for research staff	Researchers		X	X	X	Training seminars or guidelines on integrating sex/gender in research activity	SD, HR, HoDs, GE officer
6. Courses and training tools in all departments and at all levels (experienced or early researchers) on sex and gender variables	Researchers		X	X	X	Courses on specific gender dimensions, per research activity (department)	SD, HR, HoDs, GE officer

Area 5. Measures against gender-based violence, including sexual harassment

Objective: Raising awareness about the importance of equality issues and strengthening positive attitudes towards diversity

Action/Measure	Target	Timeline				Indicator(s)	Responsible
		2022	2023	2024	2025		
1. Training on discrimination phenomena (including discriminatory language), violence (including that based on prejudice or gender), harassment, and sexual harassment	Researchers, technical and administrative staff		X	X	X	Participation in training, per categories Skills acquired in identifying and responding to discrimination and violence phenomena	GD, HR, HoDs, GE officer
2. Develop an internal (institute) electronic tool (website/platform) supporting information and education, as well as allowing the reporting of sexual harassment and discrimination	Researchers, technical and administrative staff	X	X	X	X	Dedicated research institute website/platform, number of visits, number of real-case situations reported and solved	GD, HoDs, HR, IT services, GE officer
3. Reinforce de Code of Ethics of the institute with provisions against gender-based violence, including sexual harassment	Researchers, technical and administrative staff	X	X	X	X	Initiatives for raising awareness of female role models Initiatives for raising awareness on gender diversity in research teams	GD, HoDs, HR, GE officer
4. Awareness campaign highlighting diversity and inclusiveness in the scientific community and encouraging prevention of discrimination in various areas	Researchers, technical and administrative staff	X	X	X	X	Awareness campaign	GE officer

IV. Monitoring and evaluation of the GEP

In the implementation of the GEP at the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", the progress of GE strategy aims and objectives are regularly assessed, through periodic meetings. The implementation of the GEP will be permanently monitored by the GE functions (the officer and the delegates) at the institute. The GE officer together with the GE delegates within each department are responsible for collecting data and input. They will perform a first analysis of the progress of the GEP (against the indicators) and gather knowledge and feedback.

The GE functions at the institute will conclude findings reports (once a year), which are then presented to the research institute management (GD, HoDs) and discussed. These meetings will provide valuable conclusions on the implementation of the GEP. These meetings will also provide comments and recommendations that will enable adjustments and improvements to interventions on the GEP for the following year.

The periodic reports allow the continuous review of the impact of the GEP as well as keeping the wider community informed and engaged in the progress towards gender equality. The review of progress reports includes qualitative information as well as quantitative data, such as updates on human resource data disaggregated by sex, and monitoring data to keep track of the implementation of key actions.

After their conclusion and adoption by the research institute management (Scientific Council, GD, HoDs), the periodic (annual) GE progress report is published on the institute website to be available to the entire scientific community.

Annex 1. Horizon Europe recommended methodology and areas of intervention for the gender equality plan

Începând cu 2022, pentru toate propunerile care sunt depuse în Orizont Europa planul de egalitate de gen (GEP – Gender Equality Plan) este o condiție de eligibilitate (!) pentru următoarele tipuri de organizații[4]:

- Organisme publice, cum ar fi organismele de finanțare a cercetării, ministerele naționale sau alte autorități publice, inclusiv organizațiile publice cu scop lucrativ
- Instituții de învățământ superior, publice si private
- Organizații de cercetare, publice și private

Organizațiile individuale care aplică în orice parte a Orizont Europa și aparținând categoriilor de entități juridice stabilite în statele membre ale UE sau în țările asociate menționate mai sus, trebuie să aibă un GEP.

Acest criteriu de eligibilitate nu se aplică altor categorii de entități juridice, cum ar fi organizațiile private cu scop lucrativ, inclusiv IMM-urile, organizațiile neguvernamentale sau organizațiile societății civile.

Organizațiile de finanțare a cercetării vor trebui să-și examineze procedurile de evaluare a propunerilor de proiect și să ia în considerare procese mai ample de programare și de luare a deciziilor în ceea ce privește rezultatele și impactul deciziilor de finanțare și cadrele de politică asociate care au impact asupra egalității de gen în cercetare și inovare.

Criteriul de eligibilitate Orizont Europa impune ca GEP să fie un document oficial publicat pe website-ul instituției și semnat de conducerea organizației.

I. Elemente cheie

➢ Planul de egalitate de gen (GEP) trebuie să fie **publicat pe website-ul public al organizației.** Publicarea planului de egalitate de gen pe website-ul unei organizații semnalează public angajamentul acesteia față de egalitatea de gen și permite responsabilitatea adecvată față de scopurile și obiectivele planului de către personalul organizației, partenerii, părțile interesate și comunitatea mai largă.

[4] Abordarea este legată de Strategia europeană pentru egalitatea de gen 2020-2025 a Comisiei Europene, care a anunțat ambiția pentru o cerință GEP pentru organizațiile participante. Consiliul Uniunii Europene, în concluziile sale privind Noul Spațiu European de Cercetare (SER) din decembrie 2020, a cerut, de asemenea, Comisiei și statelor membre să acorde o atenție reînnoită asupra egalității de gen și a integrării acestei perspective, inclusiv prin GEP-uri și integrarea dimensiunii de gen. în R&I (Sursa: https://ec.europa.eu/info/policies/justice-and-fundamental-rights/gender-equality/gender-equality-strategy_en)

Planul de egalitate de gen poate fi publicat în limba de lucru a organizației, folosind un limbaj clar, fără ambiguitate și accesibil.

Informațiile de bază și angajamentele prezentate în planul de egalitate de gen care sunt publicate ar trebui să fie conforme cu regulamentul general privind protecția datelor (GDPR).

➢ Planul de egalitate de gen (GEP) trebuie **să fie semnat de conducerea superioară a organizației.** GEP ar trebui să fie un document strategic asumat de conducerea superioară a organizației. Acesta ar trebui să fie semnat de șeful executiv al organizației, cu un lider desemnat în mod clar din echipa de conducere pentru a duce planul mai departe.

Conducerea superioară a organizației are întreaga responsabilitate pentru implementarea angajamentelor stabilite în GEP. Aceasta va fi responsabilă pentru succesul GEP în cadrul organizației.

➢ Planul de egalitate de gen (GEP) trebuie **să fie comunicat activ în cadrul instituției.** Pe lângă publicarea GEP în domeniul public, acesta ar trebui, de asemenea, diseminat și comunicat în mod activ în întreaga organizație pentru a semnala sprijinul conducerii pentru acest plan. Este foarte important să se ia în considerare mesajele cheie care trebuie comunicate și modul în care acestea ar trebui adaptate diferitelor grupuri țintă.

➢ Planul de egalitate de gen (GEP) trebuie **să fie însoțit de rapoarte regulate de progres.** După publicarea GEP pe website-ul public al organizației, organizația ar trebui, de asemenea, să publice rapoarte regulate de progres. Rapoartele de progres pot include informații calitative alături de date cantitative, cum ar fi actualizări ale datelor despre resursele umane dezagregate pe sex sau date de monitorizare pentru a urmări implementarea acțiunilor cheie.

GEP ar trebui să precizeze clar:

- Angajamentul organizației față de egalitatea de gen
- Obiectivele și rezultatele dorite ale GEP
- Date de referință și ținte relevante
- Detalii despre acțiunile care sunt sau vor fi întreprinse de organizație, inclusiv alocarea de resurse dedicate

Pentru a îndeplini criteriul de eligibilitate Orizont Europa, este esențial ca GEP să includă angajamente specifice, obiective, acțiuni și resurse dedicate îmbunătățirii egalității de gen în cadrul organizației și activităților acesteia.

II. Metodologia de înființare a unui GEP în organizație de cercetare

1. Resurse dedicate[5]

Universitatea/organizația de cercetare ar trebui să ia în considerare alocarea de resurse (umane și financiare) relevante pentru dimensiunea și volumul activităților sale.

De exemplu, organizația poate avea un ofițer GE (ca funcție distinct[) în fiecare departament plus delegați GE (de exemplu, un astfel de delegat per departament) cu un rol proactiv sau de consultant, care să fie responsabil de monitorizarea și asigurarea faptului că procedurile și practicile la locul de muncă respectă egalitatea de gen.

Exemple de resurse umane care pot fi dedicate activităților de gen sunt:

- Crearea unui Birou/Unitate pentru Egalitatea de Gen
- Ofițer pentru egalitatea de gen (pentru întreaga organizație)
- Responsabil pentru egalitatea de gen în cadrul fiecărui departament (persoană focală), cu responsabilități pentru activitățile de egalitate de gen
- Altele

Rolul funcției/structurii de egalitate de gen include următoarele procese:

- înființarea, implementarea, monitorizarea și evaluarea GEP
- să ofere sprijin practic și instrumente actorilor implicați în implementarea GEP
- să coopereze și să implice părțile interesate la toate nivelurile pentru a asigura implementarea măsurilor GEP
- creșterea gradului de conștientizare cu privire la beneficiile egalității de gen în organizațiile de cercetare
- să evalueze progresul către egalitatea de gen în organizație

2. Implicarea întregii organizații

Un GEP eficient este un document strategic care **implică întreaga organizație**. Planurile de egalitate de gen necesită sprijinul și angajamentul oficial al conducerii superioare, și funcționează cel mai bine atunci

[5] Volumul și structura resurselor dedicate pentru dezvoltarea și implementarea GEP ar trebui să fie adecvate dimensiunii și nevoilor organizației și GEP-ului acesteia. Vor fi necesare resurse pe parcursul întregului GEP, inclusiv audit, planificare, implementare, monitorizare și revizuire.

când sunt dezvoltate cu implicarea activă a întregii organizații, inclusiv personalul, studenții și părțile interesate – și implicând atât femei, cât și bărbați.

Ar trebui implicate următoarele structuri:

- Managementul superior și echipa de conducere
    - Organe de conducere
    - Servicii administrative, inclusiv departamente de Resurse Umane (HR) și juridice
    - Departamente academice, școli, centre de cercetare sau direcții științifice și departamente de politici de cercetare
    - Comitete de evaluare a cercetării
    - Savanți și experți în domeniul egalității de gen în organizațiile de cercetare
    - Manageri de cercetare
    - Manageri de facilități
- Personalul și cadrele universitare, inclusiv sindicatele sau organismele reprezentative
    - Studenți și sindicate studențești (sau alte organisme reprezentative)

3. Procese cuprinse în crearea GEP

Următoarele procese sunt obligatorii în cadrul Orizont Europa:

1. Analiză (audit)

1.1. Colectare de date

- Definirea indicatorilor pentru colectarea datelor (vezi Anexa 2)

- Colectarea datelor dezagregate pe sexe și/sau pe gen

1.2. Analiza datelor

- Identificarea inegalităților de gen și cauzelor acestora

- Efectuarea unei revizii interne a planurilor sau acțiunilor existente pentru a asigura că cerințele obligatorii GEP și domeniile recomandate sunt abordate

- Abordarea oricărei lacune care poate fi identificată în planurile și politicile existente

2. Planificare

- Definirea zonelor de intervenție în planul de egalitate de gen (Caseta 1)

- Stabilirea obiectivelor și țintelor pentru GEP

- Stabilirea unui plan de acțiuni și măsuri

- Alocarea resurselor și responsabilităților pentru implementarea GEP

- Definirea termenelor de implementare

3. Implementare

- Crearea de grupuri de lucru pentru a dezvolta și implementa noi politici și proceduri

- Implementarea planului de acțiune GEP

4. Monitorizare și evaluare

- Definirea indicatori pentru a măsura progresul implementării GEP

- Revizuirea continuă a progresului

- Ajustări și îmbunătățiri

Caseta 1. Zone de intervenție recomandate de programul Orizont Europa pentru planul de egalitate de gen

Următoarele domenii de egalitate de gen sunt recomandate („obligatorii”) în cadrul Orizont Europa:

Echilibrul dintre viața profesională și viața privată și cultura organizațională

Echilibrul de gen în conducere și luarea deciziilor

Egalitatea de gen în recrutare și progres în carieră

Integrarea dimensiunii de gen în conținutul de cercetare și predare

Măsuri împotriva violenței bazate pe gen, inclusiv hărțuirea sexuală

(Sursa: Horizon Europe guidance on gender equality plans, https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ffcb06c3-200a-11ec-bd8e-01aa75ed71a1)

Atenție! Vezi Disclaimer 2

Annex 2. Horizon Europe recommended indicators for data collection and analysis

(Source: Horizon Europe guidance on gender equality plans, https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ffcb06c3-200a-11ec-bd8e-01aa75ed71a1)

Relevant data on gender equality for all organisations can include:

• Staff numbers by sex/gender at all levels, by disciplines, function (including administrative / support staff) and by contractual relation to the organisation;

• Average numbers of years needed for women and men to make career advancements (per grade and by discipline);

• Wage gaps by sex/gender and job;

• Numbers of women and men in academic and administrative decision-making positions (e.g. top management team, boards, committees, recruitment and promotion panels);

• Numbers of female and male candidates applying for distinct job positions;

• Numbers of women and men having left the organization in past years, specifying the numbers of years spent in the organization;

• Numbers of staff by sex/gender applying for/taking parental leave, for how long and how many returned after taking the leave;

• Number of absence days taken by women and men and according to absence motive;

• Number of training hours/credits attended by women and men;

Specific data on gender equality relevant to research performing organizations (RPOs) may include:

• Number of female and male students at all levels and for all disciplines, and academic and employment outcomes;

• Share of women and men among employed researchers;

• Share of women and men among applicants to research positions, among persons recruited, and success rate, including by scientific field, academic position, and contract status;

• Share of women and men in recruitment or promotion boards, heads of recruitment or promotion boards, and share of decision-making bodies, including by scientific field.

Annex 3. List of sources used for the literature review

(in alphabetic order)

Council of Europe Gender Equality Commission, https://www.coe.int/en/web/genderequality/gender-equality-commission

EU FESTA - Gender Issues in Recruitment, Appointment and Promotion Processes – Recommendations for a Gender Sensitive Application of Excellence Criteria, https://eige.europa.eu/sites/default/files/festa_gender_issues_recruitment_appointment_promotion.pdf

EU Strategy for Gender Equality 2020-2025, https://ec.europa.eu/info/policies/justice-and-fundamental-rights/gender-equality/gender-equality-strategy_en

EUA - Universities' Strategies and Approaches towards Diversity, Equity and Inclusion, https://eua.eu/downloads/publications/universities-39-strategies-and-approaches-towards-diversity-equity-and-inclusion.pdf

EUCEN - Diversity, Equity and Inclusion in European Higher Education Institutions, https://eua.eu/downloads/publications/web_diversity%20equity%20and%20inclusion%20in%20european%20higher%20education%20institutions.pdf

European charter & code of conduct for the recruitment of researchers, https://cdn2.euraxess.org/sites/default/files/policy_library/ttf_goal_2_results_v1.0.pdf

European Institute for Gender Equality, https://eige.europa.eu

GARCIA – Mapping organizational work-life policies and practices, https://eige.europa.eu/sites/default/files/garcia_report_mapping_org_work-life_policies_practices.pdf

Guidelines for using gender-sensitive language in communication, research and administration, https://eige.europa.eu/sites/default/files/reutlingen_university_guidelines_for_using_gender-sensitive_language.pdf

Horizon Europe General Annexes, https://ec.europa.eu/info/funding-tenders/opportunities/docs/2021-2027/horizon/wp-call/2021-2022/wp-13-general-annexes_horizon-2021-2022_en.pdf

Horizon Europe guidance on gender equality plans, https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ffcb06c3-200a-11ec-bd8e-01aa75ed71a1

LERU - Equality, diversity and inclusion at universities: the power of a systemic approach, https://www.leru.org/publications/equality-diversity-and-inclusion-at-universities

Science Europe - Practical Guide TO Improving Gender Equality in Research Organisations, https://eige.europa.eu/sites/default/files/se_gender_practical-guide.pdf

Student evaluations of teaching (mostly) do not measure teaching effectiveness, https://eige.europa.eu/sites/default/files/science_open_research_student_eval_teaching_effectiveness.pdf

Ghid de întocmire şi redactare a tezei de doctorat în cadrul Școlii de Studii Avansate a Academiei Române - SCOSAAR

I. Consideraţii generale

Studiile universitare de doctorat se finalizează prin elaborarea şi susţinerea publică a unei teze de doctorat.

Teza de doctorat trebuie să fie rezultatul unei cercetări ştiinţifice şi să conţină rezultate originale în domeniul cunoaşterii ştiinţifice.

Rezultatele de cercetare prezentate în teză, obţinute în cadrul programului de studii universitare de doctorat, trebuie să respecte criteriile de evaluare a calităţii unei teze de doctorat.

Doctorandul este autorul lucrării şi îşi asumă corectitudinea informaţiilor, datelor, demonstraţiilor şi opiniilor prezentate în teză.

Protecţia drepturilor de proprietate intelectuală asupra tezei de doctorat se asigură în conformitate cu prevederile contractului de studii universitare de doctorat, respectând reglementările prevăzute de legea specială în materie.

Teza de doctorat trebuie sa fie o lucrare originală, fiind obligatorie menționarea sursei pentru orice material preluat.

Conducătorul de doctorat răspunde împreună cu autorul tezei de respectarea standardelor de calitate sau de etică profesională, inclusiv de asigurarea originalității conținutului, potrivit prevederilor art. 170 din Legea educației naționale nr. 1/2011.

Prezentul ghid cuprinde elementele de bază care trebuie respectate la redactarea tezelor de doctorat.

De regulă, teza de doctorat se redactează în limba română sau într-o limbă de circulaţie internaţională, cu un rezumat de aproximativ 20 de pagini, redactat în limba română şi într-o limbă de circulaţie internaţională.

II. Structura tezei de doctorat

Prezentul ghid are rolul de a ajuta studentul-doctorand în realizarea tezei de doctorat fără a-i impune constrângeri care să limiteze prezentarea datelor, metodologia de cercetare utilizată, prezentarea şi interpretarea rezultatelor obţinute.

- Copertă – modelul copertei (Anexa 1);
- Pagina de titlu – modelul paginii de titlu (Anexa 2);
- Cuprins;
- Lista cu abrevieri şi simboluri;
- Introducere;
- Conţinut;
- Concluzii şi contribuţii personale;
- Bibliografie;
- Anexe.

Două exemplare imprimate din teza de doctorat vor fi depuse la Compartimentul SCOSAAR și Studii Postdoctorale și vor fi legate în coperți cartonate, însoțite de un CD inscripționat cu teza în format PDF.

Coperta tezei de doctorat trebuie să cuprindă următoarele informații: sigla și denumirea IOSUD (Școala de studii avansate a Academiei Române - SCOSAAR), denumirea IOD (Institutul organizator de doctorat), denumirea documentului (teză de doctorat), conducătorul ştiinţific, autorul tezei, anul.

Pagina de titlu: de regulă pagina de titlu repetă informaţiile de pe copertă, completate cu titlul tezei de doctorat.

Cuprinsul conţine titlurile şi subtitlurile tuturor capitolelor şi subcapitolelor, însoţite de numărul paginii de început al fiecărui capitol/subcapitol.

Lista cu abrevieri şi simboluri

Lista cu simbolurile, abrevierile și notaţiile utilizate frecvent în teză trebuie să respecte standardele utilizate în literatura de specialitate și se scriu în ordine alfabetică.

Reguli de redactare, tehnoredactare

Teza de doctorat trebuie redactată pe computer şi tipărită la imprimantă, într-o formă care trebuie să respecte următorul set de criterii:

- Fontul Times New Roman, cu dimensiunea de 12;
- Formatul de pagină: A4, scrisă numai pe o faţă;
- Margini: sus/jos=2.5 cm, stânga=3 cm, dreapta=2,5 cm;
- Spaţiere randruri: 1,5;
- Titlurile capitolelor, cu majuscule şi pe pagină nouă;
- Titlurile subcapitolelor sau subpunctelor, în continuarea textului, la două linii distanţă, cu litere bold.

Planul de numerotare a capitolelor şi subcapitolelor trebuie să pună în evidenţă importanţa şi legăturile dintre diferite părţi ale lucrării. Este foarte important să se caute titluri semnificative pentru capitole, subcapitole, paragrafe, care să reprezinte o idee de dezvoltare, evitându-se multiplicarea subdiviziunilor.

Numerotarea paginilor:

- teza va avea paginile numerotate, începând cu prima pagină de text propriu-zis (fără pagina de gardă) şi până la sfârşitul imprimatului.
- numărul paginii se inserează în subsolul paginii, centrat.

Planul de numerotare recomandat este cel zecimal pentru că rangul cifrei indică natural nivelul de detaliere. Este recomandat ca o lucrare să aibă următorul plan de numerotare:

l.Capitolul 1
1.1.Subcapitolul 1
1.1.1. Paragraful l
1.1.2. Paragraful 2
.....
1.1.n.Paragraful n
.....
l.n. Subcapitolul n

Citarea surselor de informare în Teza de doctorat este o obligaţie ce rezultă din etica cercetării, din etica profesională.

Introducerea

Introducerea tezei de doctorat are rolul de a situa cercetarea într-un context temporal, istoric, geografic, profesional și se întinde pe aproximativ 5-6 pagini.

Introducerea trebuie să conţină:

- motivaţia alegerii temei de cercetare;
- importanţa, noutatea şi actualitatea temei;
- încadrarea temei în preocupările internaţionale, naţionale ale colectivului de cercetare;
- formularea ipotezei de cercetare;
- obiectivele științifice;
- comentarii sintetice privind metoda de cercetare abordată și metodologia cercetării;
- prezentarea pe scurt a conţinutului lucrării, cu sublinierea rezultatelor obţinute;
- evidenţierea caracterului interdisciplinar al cercetărilor efectuate, acolo unde se impune;
- se pot indica limitele cercetărilor efectuate/elaborarii tezei şi perspectivele de continuare a cercetărilor.

Conţinutul tezei

Conţinutul tezei de doctorat este stabilit de studentul-doctorand prin consultare cu conducătorul de doctorat.

Având în vedere faptul că teza de doctorat trebuie să demonstreze cunoaşterea ştiinţifică avansată a domeniului de doctorat, aceasta trebuie să conţină elemente de originalitate în dezvoltarea sau soluţionarea temei de cercetare, precum şi modalităţi de validare ştiinţifică a rezultatelor proprii. Conținutul lucrării trebuie structurat în două părţi, în funcție de domeniu:

- partea generală/Stadiul actual al cunoaşterii – reprezintă 1/3 din conţinutul tezei;

- partea de contribuţie personală (originală) – reprezintă 2/3 din conţinutul tezei de doctorat

Concluzii

Concluziile trebuie să fie relevante, să vină ca urmare a analizelor realizate în teză şi să fie însoţite de argumente pertinente. Acestea se referă la originalitatea rezultatelor, aplicabilitatea rezultatelor, limitele cercetării și posibilele direcţii viitoare de cercetare. Această parte va sintetiza rezultatele cercetării şi ale analizelor efectuate de către studentul-doctorand.

Anexe

Uneori, pentru a da mai multă fluenţă conţinutului Tezei de doctorat, se recomandă ca unele tabele, grafice, desene, fotografii, programe de calculator să fie prezentate la sfârşitul acesteia într-una sau mai multe anexe.

Bibliografia

Referinţele bibliografice vor conţine resursele bibliografice folosite de studentul-doctorand în scopul realizării tezei de doctorat conform sistemului de citare utilizat în domeniu. Se recomandă redactarea bibliografiei în format Harvard Citation.

Exemplu -Bibliografie in ordine alfabetică şi numerotată în format Harvard Citation:

(1) Cheung, R.; Vogel, D., 2011. *Can facebook enhance the communications between teachers and students?*, The International Journal of Learning, 17(11), pp. 365-397.
(2) http://www.statistica.com/statistics/278414/number-of-worldwide-social-network-users/, accessed on january 5, 2015.
(3) http://socialmediatraining.ro/2014/05/07/social-media-overview-in-romania/, accessed on january 23, 2015.

Rezumatul Tezei de doctorat

Rezumatul se editează pe suport de hârtie folosind aceleaşi caracteristici de redactare ca şi teza. Numărul de pagini nu trebuie să fie mai mare de 30-35 pagini. Rezumatul se printează şi se copertează separat faţă de teză.

Structura formală a rezumatului:

- Pagina de titlu (Anexa 3);
- Cuprins (cuprinsul tezei);
- Sinteza ideilor principale (obiectivele, metodologia de cercetare, sinteza capitolelor, respectând structura pe capitole, concluzii şi contribuţii personale);
- Bibliografie.

Fiecare institut va trebui să completeze prezentul ghid cu caracteristicile domeniului în care studentul-doctorand își redactează teza.

Etapa I:

Implementarea proiectului in perioada aprilie - decembrie 2011 s-a facut prin realizarea Etapei I, si anume: "Conceperea, prepararea si caracterizarea diferitelor tipuri de nanoparticule".

S-a predat un raport stiintific in care au fost prezentate rezultatele obtinute in cadrul activitatilor:

Activitate I.1: Organizarea workshopului de incepere a proiectului NANODIATER cu participarea reprezentanţilor întregului consorţiu
Activitate I.2: Realizarea site-ului Web al proiectului NANODIATER
Activitatea I.3: Prepararea liposomilor-ţintă senzitivi (TSL), (P1:IBPC) luni: 1-36
Activitatea I.5 Caracterizarea lipozomilor ţintă-senzitivi (TSL) (P2: UPB), luni: 2-12
Activitatea I.6: Evaluarea stabilitatii lipozomilor ţintă-senzitivi (TSL) (P1:IBPC), luni: 2-12
Activitatea I.9 Optimizarea NP tintite (P1:IBPC, partener strain: Univ. Istanbul), luni: 6-18
Activitatea I.10 Evaluarea expresiei VCAM-1 pe suprafaţa diferitelor linii de celule endoteliale (CE) (P1:IBPC, partener strain: Univ. Bonn), luni: 3-12
Activitatea I.11 Evaluarea legarii NP tintite catre diferite CE, în condiţii statice şi dinamice (P1:IBPC, partener strain: Univ. Bonn), luni: 3-24
Activitatea I.12 Eliberarea markerului incorporat in diferite tipuri de NP directionate după legarea la tinta moleculara de pe CE (P1:IBPC, partener strain: Univ. Bonn), luni: 3-9
Activitatea I.14 Investigarea soartei TSL după legarea la ţintă (P2: UPB), luni: 6-12
Activitatea I.15 Încapsularea diferitilor inhibitori chemokinici (CA şi CRA) în NP tintite (CA / CRA-NP) şi detectarea eliberarii lor după legarea la ţintă (P1:IBPC, P2:UPB, partener strain: Univ. Bonn, partener strain: Univ. Istanbul), luni: 3-24

Concluzii Etapa I: Au fost preparati si caracterizati liposomi tinta-senzitivi cuplati cu peptide ce recunosc molecula de adeziune VCAM-1 (TSL-Vp), capabili sa se dezintegreze si sa elibereze continutul dupa legarea specifica la suprafata celulelor endoteliale activate si au fost efectuate experimente de incorporare a antagonistilor de receptori chemokinici in TSL-Vp si s-a urmarit efectul inhibitor al acestora asupra adeziunii si transmigrarii monocitelor la/prin stratul de celule endoteliale.

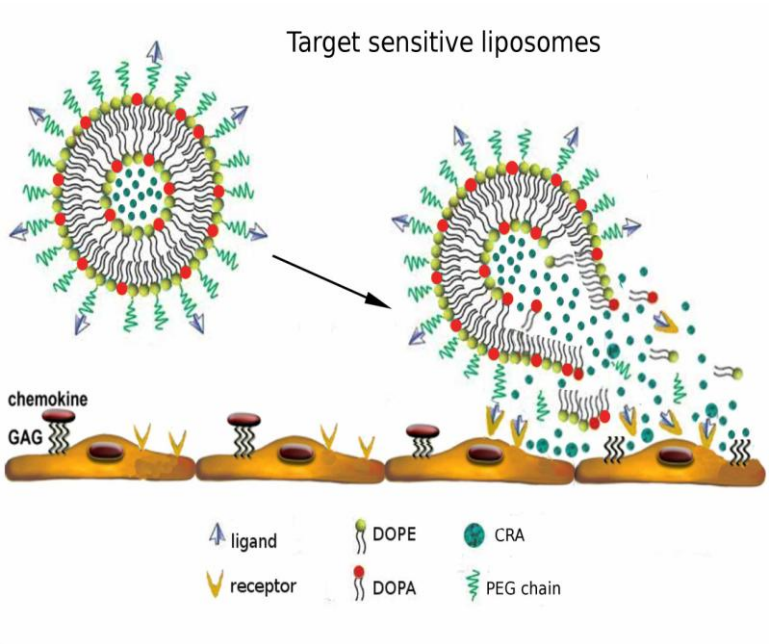


Figura 1. Reprezentarea schematica a liposomilor tinta-senzitivi conceputi sa se destabilizeze si sa elibereze medicamentul incorporart dupa legarea la suprafata celulei tinta

De asemenea, pe baza rezultatelor obtinute in prima etapa a proiectului se poate aprecia ca, printr-o selectionare atenta a modului de sinteza a nanoparticulelor de aur, acestea pot fi utilizate pentru cuantificarea indirecta a unor specii/biospecii analitice, pe baza efectului electrocatalitic manifestat fata de reactia catodica de descarcare a hidrogenului. Prin asamblarea nanoparticulelor de Au functionalizate cu anticorpi specifici, se poate construi un biosenzor electrochimic usor de manipulat si interpretat, la un cost competitiv.

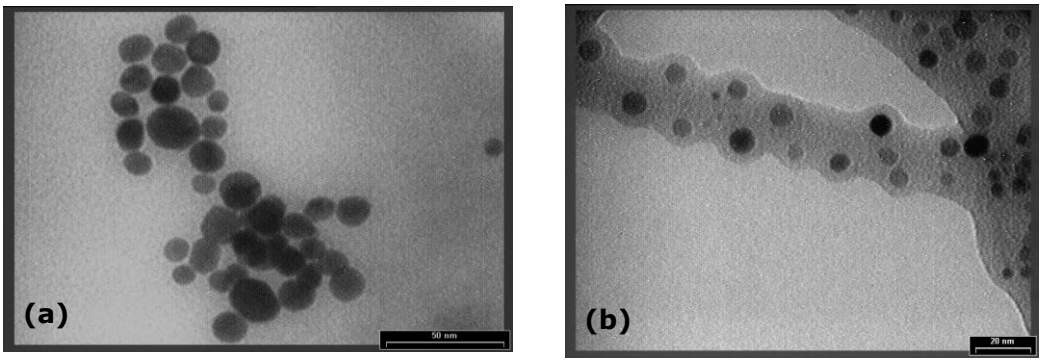


Figura 2. Micrografii obtinute cu ajutorul microscopului elctronic de transmisie (TEM) (a) pentru AuNP-MS si (b) AuNP-MS conjugate cu anticorpi IgG

Etapa II:

Implementarea proiectului in perioada ianuarie-decembrie 2012 s-a facut prin realizarea Etapei 2: "Evaluarea efectului terapeutic al inhibitorilor chemokinici transportati de catre nanoparticule directionate catre receptori specifici celulelor endoteliale activate".

Activitatile etapei II sunt prezentate mai jos:

Activitate II.1: Prepararea liposomilor-ţintă senzitivi (TSL), (P1:IBPC), luni: 1-36

Activitate II.2: Prepararea de nanoparticule polimerice (PNP) directionate catre ţinte specifice, (partener strain: Univ. Istanbul), luni: 1-32

Activitate II.3: Optimizarea NP tintite (P1:IBPC, partener strain: Univ. Istanbul), luni: 6-18

Activitatea II.4: Evaluarea legarii NP tintite la diferite CE, în condiţii statice şi dinamice, (P1:IBPC, partener strain: Univ. Bonn), luni: 3-24

Activitatea II.5: Încapsularea diferitilor inhibitori chemokinici (CA şi CRA) în NP tintite (CA / CRA-NP) şi detectarea eliberarii lor după legarea la ţintă, (P1:IBPC, P2:UPB, partener strain: Univ. Bonn, partener strain: Univ. Istanbul), luni: 3-24

Activitatea II.6: Efectul CA/CRA-NP asupra inflamatiei celulelor endoteliale, studii in vitro în condiţii statice de adeziune a leucocitelor la CE, (P1:IBPC), luni: 6-24

Activitatea II.12: Testarea nanoparticulelor tintite (CA/CRA-NP) folosind un model de soarece care dezvolta ateroscleroza, (P1:IBPC), luni: 18-26

Activitatea II.15: Selectarea bioreceptorilor specifici pentru evitarea reactiilor de interferenta, (P1: IBPC, P2:UPB, P3: Optoelectronica), luni: 13-24

Activitatea II.16: Evaluarea şi optimizarea componentelor biosenzorului, (P2:UPB, P3: Optoelectronica), luni: 19-24

Activitatea II.17: Dezvoltarea partii electronice şi a pachetului de software pentru pentru cuantificarea NP metalice şi detectarea celulelor specifice, (P2:UPB, P3: Optoelectronica), luni: 12-28

Activitatea II.18: Elaborarea specificaţiilor tehnice de construcţie a biosenzorului bazate pe studii de laborator in vitro şi in vivo, (P2:UPB, P3: Optoelectronica, partener strain: EPO Berlin), luni: 20-24

Activitate II.19: Seminarii stiintifice cu participarea partenerilor romani pentru a evalua stadiul proiectului si a lua decizii pentru etapele urmatoare

Activitatea II.20: Organizare/Participare workshopuri proiect cu participarea reprezentantilor tuturor partnerilor pentru evaluarea stadiului proiectului si pentru a se lua decizii privind desfasurarea proiectului.

Concluzii Etapa II: au fost preparati si caracterizati liposomi tinta-senzitivi cuplati cu peptide ce recunosc molecula de adeziune VCAM-1 (TSL-Vp) in care au fost incorporati antagonisti de receptori chemokinici CCR2 care sunt eliberati in vecinatatea celulei dupa legarea TSL-Vp la tinta VCAM-1 de pe suprafata celulelor endoteliale activate. Efectul inhibitor al antagonistilor de CCR2 transportati de TSL-Vp asupra adeziunii si transmigrarii monocitelor la/prin stratul de celule endoteliale a fost determinat. Au fost efectuate studii pe modele animale pentru testarea acumularii liposomilor directionati catre VCAM-1 in zone cu endoteliu activat ale aortelor soarecilor ApoE-/-. De asemenea, a fost proiectata si executata partea electronica si pachetul software al biosenzorului care poate detecta concentratia de nanoparticule de aur cuplate cu anticorpi ce recunosc specific antigene libere sau antigene de pe suprafata celulelor tumorale metastatice sau a celulelor inflamatorii din sângele periferic. Nanoparticulele de aur sintetizate de tip Au-MS conjugate cu anticorpi furnizeaza un raspuns liniar fata de mai multi parametri electrochimici semnificativi, respectiv: curentul catodic de degajare al H2 si sarcina electrica acumulata la un potential catodic constant, rezistenta de transfer de sarcina.

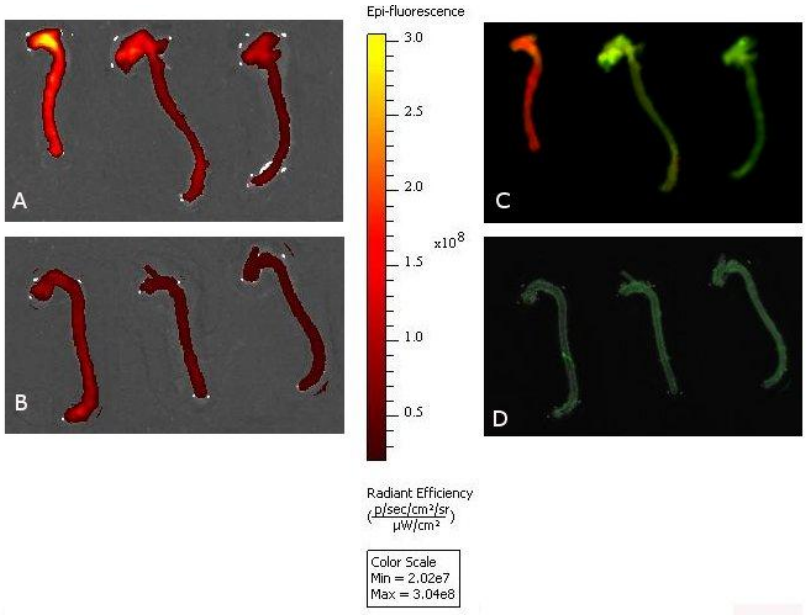


Figura 3. Imaginile de fluorescenta suprapuse cu imaginile fotografice ale aortelor provenite de la soareci ApoE-deficienti sau C57 BL, incubate in situ cu liposomi directionati catre VCAM-1 (aorta din stanga imaginilor), liposomi ne-directionati (aorta din mijlocul imaginilor) sau cu PBS (aorta din dreapta imaginilor) obtinute cu ajutorul aparatului IVIS 200 Caliper folosind λex = 535 nm and λem = 620 nm. Aorte provenite de la soareci ApoE-deficienti (A); Aorte provenite de la soareci C57BL (B) Separarea spectrala realizata cu ajutorul software "Living image software" pentru aortele provenite de la soareci ApoE-deficienti (C) sau C57BL (D) prezinta cu verde autofluorescenta tesutului si cu rosu fluorecenta specifica data de liposomii care se leaga de aorta.

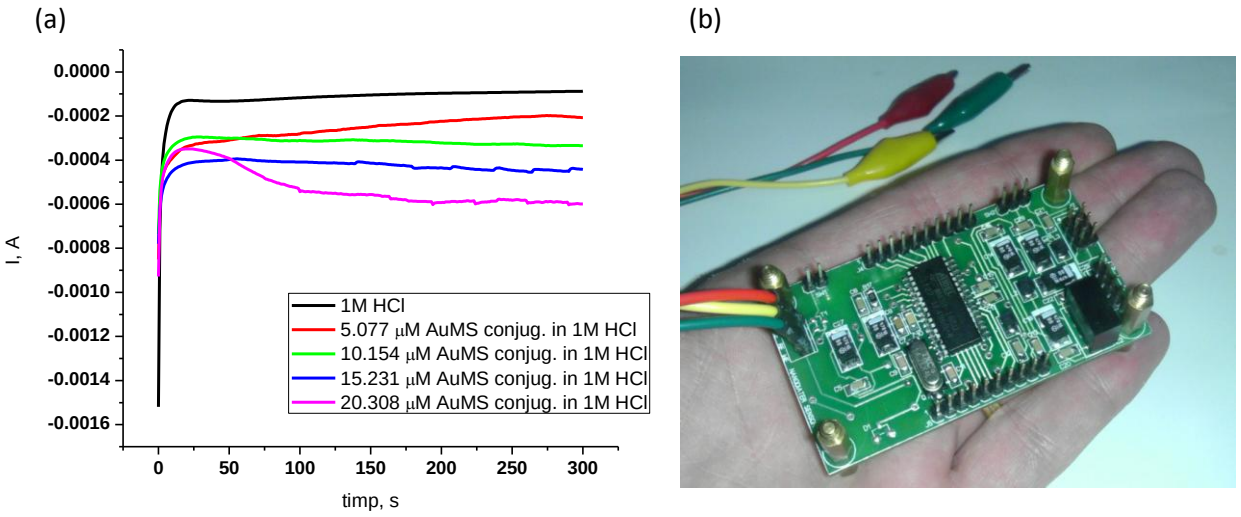


Figura 4. (a) Cronoamperograme inregistrate la E = -1.0V/ Ag ref.pentru solutii avand diferite concentratii de nanoparticule de Au conjugate, de tip Au-MS-anti-human IgG in 1M HCl pe SPE (dupa aplicarea unui pre-tratament constand in aplicarea unei polarizari la +1.35V/Ag ref. timp de 30 s); (b) placa de baza a biosenzorului Nanodiater

Etapa III:

Implementarea proiectului in perioada ianuarie-decembrie 2013 s-a facut prin realizarea Etapei 3: "Dezvoltarea unui kit de diagnostic bazat pe biosenzor pentru cuantificarea nanoparticulelor metalice şi detectarea specifica a celulelor inflamatorii sau tumorale".

S-a intocmit un raport stiintific in care au fost prezentate rezultatele obtinute in cadrul activitatilor:

Activitate III.1: Prepararea liposomilor-ţintă senzitivi (TSL), (P1:IBPC), luni: 1-36
Activitatea III.2: Testarea nanoparticulelor tintite (CA/CRA-NP) folosind un model de soarece care dezvolta ateroscleroza, (P1:IBPC), luni: 18-26
Activitatea III.3: Evaluarea efectului administrarii CA/CRA-NP asupra dezvoltării plăcilor aterosclerotice la soareci Apo-E-deficienti (P1: IBPC), luni: 24-36
Activitatea III.4: Investigarea raspunsului inflamator după tratarea soarecilor ApoE-deficienti cu CA/CRA-NP (P1: IBPC), luni: 24-36
Activitatea III.5: Dezvoltarea partii electronice şi a pachetului de software pentru pentru cuantificarea NP metalice şi detectarea celulelor specifice (P2: UPB-CSSNT, P5: Optoel), luni: 12-28
Activitatea III.6: Evaluarea "Sezorului celular" în condiţii ex vivo (P1: IBPC, P2: UPB-CSSNT, P5: Optoel, partener strain: EPO GmbH Berlin, Germania), luni: 24-36
Activitatea III.7: Depunerea unei cereri de brevet pentru nanoparticule tintite
Activitate III.8: Seminarii stiintifice cu participarea partenerilor romani pentru a evalua stadiul proiectului si a lua decizii pentru etapele urmatoare
Activitatea III.9: Organizare/Participare workshopuri proiect cu participarea reprezentantilor tuturor partnerilor pentru evaluarea stadiului proiectului si pentru a se lua decizii privind desfasurarea proiectului
Activitate III.10: Diseminarea rezultatelor: participari la conferinte nationale si internationale; publicare in reviste cotate ISI

Concluzii Etapa III: au fost preparati si caracterizati liposomi tinta-senzitivi cuplati cu peptide ce recunosc molecula de adeziune VCAM-1 (TSL-Vp) in care au fost incorporati antagonisti de receptori chemokinici CCR2 care sunt eliberati in vecinatatea endoteliului activat, dupa legarea TSL-Vp la tinta moleculara VCAM-1. Au fost efectuate studii pe modele animale pentru testarea acumularii liposomilor si a nanoparticulelor polimerice directionati catre VCAM-1 in zone cu endoteliu activat ale aortelor soarecilor ApoE-/-. S-a urmarit efectul terapeutic al administrarii liposomilor tinta-senzitivi directionati catre VCAM-1 si incarcati cu antagonistul CCR2, Teijin in soareci ApoE-deficienti asupra leziunilor aterosclerotice si s-a aratat ca acest tratament determina scaderea leziunilor aterosclerotice.

De asemenea, s-a executat un echipament functional de biosenzor care poate detecta concentratia de nanoparticule de aur cuplate cu anticorpi ce recunosc specific antigene libere sau antigene de pe suprafata celulelor tumorale metastatice sau a celulelor inflamatorii din sângele periferic si care permite inregistrarea masuratorilor de curenti catodici cu valori comparabile celor achizitionate utilizand aparatura electrochimica consacrata (potentiostatul) iar portabilitatea sa (dimensiuni:130mm x 67mm x 25mm) reprezinta un avantaj semnificativ pentru aplicarea sa in diagnosticarea rapida. A fost

dezvoltat si pachetul software al biosenzorului care este conceput intr-un mod flexibil permitand atat functionarea in regim de voltametrie-ciclica cat si in regim de cronoamperometrie.

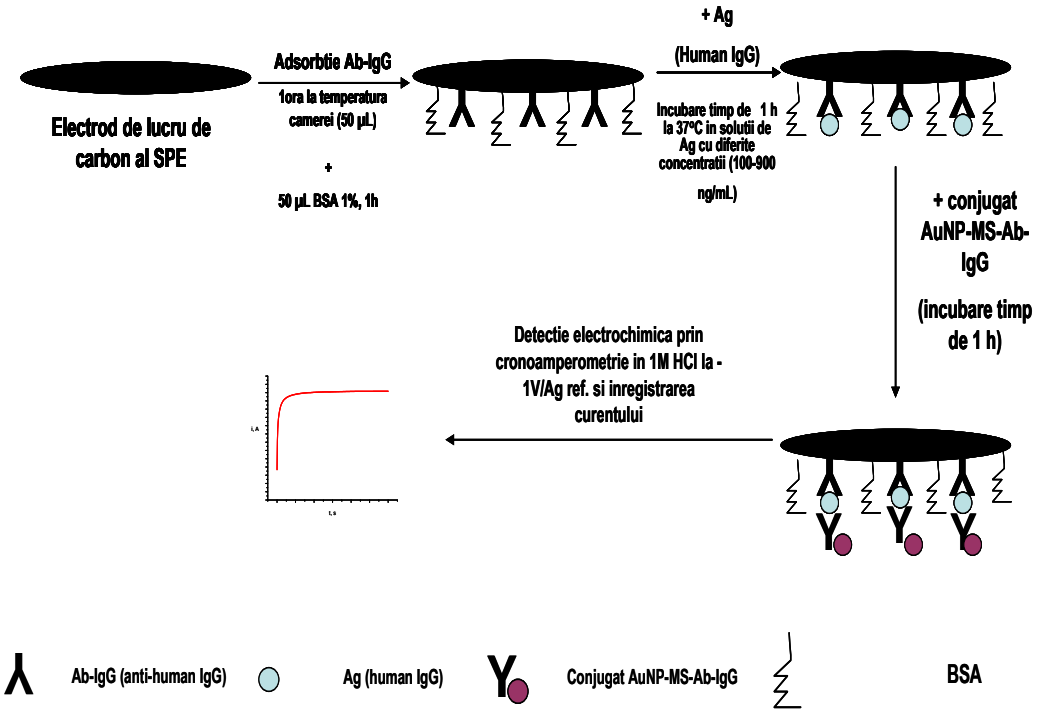


Figura 5. Schema procedurii de detectie electrochimica utilizand asamblarea sandwich pe suprafata electrodului

Figura 6. Biosenzorul "NANODIATER"

Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"
Strada B. P Hașdeu, nr. 8, Sector 5, București, România
Telefon:021.319.45.18 CIF 4364268

INFORMARE

Având în vedere condițiile de cod roșu din București din data de 18.02.2026, prin decizia Directorului Institutului de Biologie și Patologie Celulară Nicolae Simionescu nr.23/18.02.2026, se modifică calendarul concursului pentru postul de consilier juridic. Membrii comisiei de concurs au fost anunțati și au fost de acord.

Menționăm că toți candidații au fost anunțați telefonic de modificarea calendarului de concurs, care a fost modificat și pe site-ul institutului.

Secretar comisie,

RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC (RST)

PROIECT

TERAPII INTELIGENTE PENTRU BOLI NON-COMUNICABILE, BAZATE PE ELIBERAREA CONTROLATA DE COMPUSI FARMACOLOGICI DIN CELULE INCAPSULATE DUPA MANIPULARE GENETICA SAU BIONANOPARTICULE VECTORIZATE

INTERA
PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697
Contract nr. 13PCCDI/2018

FAZA I, An 2018

Rezumatul etapei

Rezultate stiintifice obtinute in aceasta faza in cadrul celor 4 proiecte componente INTERA au condus la indeplinirea obiectivelor propuse. In cadrul proiectului **INTERA-1** au fost obtinute plasmide codificatoare pentru IL-10 (proteina antiinflamatoare) si a celulelor transfectate stabil. De asemenea au fost selectate biomatrici (alginat, colagen, chitosan, dextran, etc.) si au fost optimizate conditiile de incapsulare si a fost realizat la un procedeu de obținere a unor sisteme de tip micro și macrovezicule (capsule goale în interior) sau tuburi polimerice cu caracteristici prestabilite. Dintre caracteristicile prestabilite se pot menționa: diametrul interior și exterior; porozitatea peretelui, capacitatea de schimb a peretelui, etc. Aceste sisteme sunt produse din polimeri sau compozite (alginat, chitosan, colagen, etc) în amestec cu substanțe biologic active utilizând sisteme coaxiale de ace de diametre prestabilite. Tehnologia permite ca în cazul micro- și macroveziculelor încărcarea cu substanțe biologic active să se realizeze în interiorul cavității sau în peretele capsulelor. In cadrul proiectului **INTERA-2**, au fost obtinuti constructi 3D (dextran, celuloza, PMMA, gelatina si si colagen) prin electrofilare si criogenare si au fost obtinute primele matrici 3D care au fost populate cu diferite tipuri celulare; s-a testat compatibilitatea acestora cu matricile si a fost analizata viabilitatea si fenotipul celulelor din interiorul bio-matricei 3D. In cadrul proiectului **INTERA-3** au fost obținute si caracterizate nanoparticule magnetice si nanoparticule lipidice care au fost funcţionalizate adecvat pentru livrarea țintită a polifenolilor. Au fost utilizati polifenoli puri (acid cafeic, acid tanic, acid galic, acid protocatehuic, limonen, naringenina, hesperetina) și uleiuri esențiale bogate în polifenoli (ulei de mentă, fenicul și lavandă). De asemenea, s-a realizat la nivel de prototip, un separator magnetic vertical care să permită purificarea și separarea nanoparticulelor izomagnetice. In cadrul proiectului **INTERA-4** au fost obtinute si caracterizare nanoparticule magnetice si nanoconjugati cu PEI si plasmide codificatoare pentru apoAI si apoAII; au fost determinat raportul optim de complexare NMP-PEI/ ADN; au fost obtinute si caracterizate molecule „CORE" si cuplate cu PEI. Rezultatele au fost prezentate la manifestari stiintifice, publicate sau trimise spre publicare in reviste de specialitate si au fost trimise spre patentare doua brevete de inventie.

INTERA-1 (PROIECT nr. 1): Incapsularea celulelor eucariote manipulate genetic pentru eliberarea controlata a unor produsi farmacologici activi

Etapa 2018 – Obtinerea celulelor transfectate stabil si optimizarea conditiilor de incapsulare

Activitatea 1.1. Realizarea strategiei de clonare pentru constructia unor plasmide codificatoare pentru proteine reporter si peptide antiinflamatoare

Indeplinirea obiectivelor INTERA-1

Obiectivul etapei I al subproiectului **P1-INTERA** a fost indeplinit in totalitate:

Indicatori de realizare au fost atinsi:

- Au fost analizate secventele IL-10 si a proteinelor reporter si au fost obtinute plasmidele pentru IL-10 si proteine reporter secretate
- Au fost obtinute biomatrici polimere cu functiuni specifice
- Au fost obtinute celule transfectate stabil
- A fost realizata o Tehnolologie de formare a microcapsulelor polimerice cu proprietati speciale
- A fost realizata pagina web INTERA, zu fost efectuate participari la manifestari stiintifice, a fost realizat un brevet si o lucrare stiintifica a fost trimisa spre publicare
- au fost angajati doi noi cercetatori (Alina-Gabriela Rusu – ICMPP si Laura Moise - IBPCNS), procedura de angajare a unui noi angajat la UPB fiind in desfasurare.
- Un serviciu a fost postat in platform ERRIS, la adresa https://erris.gov.ro/Department-gene-analysis Plasmid design and cloning strategies
-

Activitati de diseminare INTERA-1

1. participari la manifestari stiintifice :

- 4th International Conference on Chemical Engineering, ICCE 2018, 31.10-02.11.2018, Iasi, Romania, Conferinta plenara- Fundueanu G., Constantin M., Bucatariu S., Smart polymeric materials for controlled release of bioactive molecules.

-participarea la conferința „20th International Conference on Synthetic Polymer Chemistry, Nanoscience and Nanotechnology" Londra, UK, cu lucrarea „Synthesis and Characterization of Some Alginate Hollow Fibres Using Co-Axial Needles" Anton Ficai, Ioana Lavinia Ardelean, Roxana Doina Trusca, Bogdan Stefan Vasile, Denisa Ficai, Ecaterina Andronescu - a fost apreciată de juriul conferinței cu premiul „BEST PRESENTATION AWARD".

2. s-a realizat un brevet de invenție: *Vezicule și tuburi polimerice și tehnologie de obținere a acestora*
Autori Denisa FICAI, Andreea ILIEV, Anton FICAI, Violeta Georgeta TRUSCA, Anca Violeta GAFENCU, Sanda-Maria BUCATARIU, FUNDUEANU-Constantin Gheorghe, Maya SIMIONESCU, Ecaterina ANDRONESCU

3. A fost trimisa o lucrare spre publicare la revista JoVE (cotata ISI) "An efficient method for adenovirus production" Madalina Dumitrescu, Violeta G. Trusca, and Anca V. Gafencu. care a primit manuscript number: JoVE59105 si este in process de evaluare.

INTERA-2 (PROIECT nr. 2) Crearea unei platforme 3d concepute pentru testare pre-clinica de medicamente compusa din celule incorporate in bio-matrici tridimensionale

Etapa 2018 - Realizarea unor matrici 3D biocompatibile, functionalizate cu celule valvulare

Indeplinirea obiectivelor INTERA-2

Ca urmare a implementarii in totalitate a primei etape a proeictului P2-INTERA au fost obtinute urmatoarele ***rezultate*** si indepliniti ***indicatorii de realizare*** prevazuti:

(i) Au fost selectate mai multe tipuri de polimeri naturali (dextran, gelatina, colagen, celuloza) si sintetici (polimetilmetacrilat-PMMA, alcool polivinilic), precursori in realizarea ulterioara a criogelurilor si membranelor electrofilate;

(ii) Testele de viabilitate au demonstrat biocompatibilitatea hidrogelurilor obtinute cu celulele umane endoteliale, fibroblaste si interstitiale valvulare;

(iii) S-au stabilit liste cu combinatiile optime de polimeri, atat pentru cazul hidrogelurilor pe baza de celuloza-dextran, cat si pentru membranele electrofilate;

(iv) Criogelurile si membranele electrofilate obtinute au fost caracterizate prin stabilirea gradului de umflare, a morfologiei acestora (microscopie SEM) si a cristalinitatii probelor (difractie cu raze X).

(v) S-a analizat morfologia celulelor care au populat matricile obtinute si s-a constat ca membrana electrofilata favorizeaza dezvoltarea fenotipului specific celulelor cultivate in timp ce criogelurile nu permit o aderare totala si astfel un fenotip specific celulelor care il populeaza.

(vi) angajarea unui tanar in IBPC “N. Simionescu” (Mihaila Andreea Cristina) si a doi tineri in INCDFM (Apostol Mariana Mihaela si Sandu Alexandra).

Activitati de diseminare INTERA-2

- **Articol ISI**: Macarie RD, Vadana M, Ciortan L, Tucureanu MM, Ciobanu A, Vinereanu D, Manduteanu I, Simionescu M, **Butoi** E. The expression of MMP-1 and MMP-9 is up-regulated by smooth muscle cells after their cross-talk with macrophages in high glucose conditions. J Cell Mol Med. 2018 Sep;22(9):4366-4376.
- **Capitol Carte**: 1. Petrovici A.R., Ciolacu D. - "Natural flavours obtained by microbiological pathway" in cartea OPEN ACCES "Generation of Aromas and Flavours", ISBN 978-953-51-6240-7.
- The 22th International Salon of Research, Innovation and Technological Transfer - Inventica 2018, **27-29.06.2018**, Iasi, Romania, **Poster** - Petrovici A. R., Ciolacu D., Procedure of dextran biosynthesis by *Weissella confusa* ICMPP29 and the composition of culture media.
- International Symposium of Chemical Engineering and Materials, SICHEM 2018, **6 – 7.09.2018**, Universitatea Politehnica Bucuresti, Romania, **Comunicare Orala** - Petrovici A. R., Silion M., Roșca I., Ciolacu D., The four different culture media influences on the polymer biosynthesis.
- 4th International Conference on Chemical Engineering, ICCE 2018, **31.10-02.11.2018**, Iasi, Romania, **Comunicare Orala** - Ciolacu D. E., Petrovici A. R., New hydrogels based on cellulose for biomedical application.
- Elena Butoi, Sergiu Cecoltan, Letitia Ciortan, Razvan D Macarie, Florin Iordache, Monica Tucureanu, Mihaela Vadana, Agneta Simionescu, Maya Simionescu, Ileana Manduteanu. Constructing of 3D gelatin scaffolds for aortic valve tissue engineering, - Al X-lea Congres Național de Biologie Celulară și Moleculară cu participare internațională a XXXVI-a Sesiune Anuală a Societății Române de Biologie Celulară” Craiova, Romania, 6-9 iunie - poster premiat.
- Mihaela Vadana, Razvan Daniel Macarie, Letitia Ciortan, Monica M Tucureanu, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Elena Butoi. Molecular and cellular alterations induced by macrophage-smooth muscle cells cross-talk accountable for atherosclerosis plaque vulnerability. 27th European Cardiology Conference” Rome, Italy, October 21-24, 2018 – poster

INTERA-3 (PROIECT nr. 3) Nanobioparticule inteligente concepute pentru vectorizarea compusilor bioactivi pentru terapia inflamatiei vasculare

Etapa 2018 – Conceperea, prepararea si caracterizarea a diferite tipuri de nanoparticule pentru a fi folosite ca vectori pentru transportul țintit de polifenoli

Diseminarea si valorificarea rezultatelor, consolidare institutionala Indicatori de realizare: Creare si actualizare pagina web a proiectului; Participari la manifestari stiintifice

● A fost depusă la OSIM aplicația de brevet cu titlul: „Separator (electro)magnetic vertical a nanoparticulelor izomagnetice", Ficai Denisa, Ardelean Ioana, Ilie Cornelia, Calin Manuela, Fuior Elena-Valeria, Fifere Adrian, Pinteala Mariana, Fundueanu Gheorghe, Ficai Anton, Simionescu Maya, Andronescu Ecaterina, nr. inregistrare A/01055 din 5.12.2018.

● Participarea la manifestari stiintifice internationale:

1. „International Symposium of Chemical Engineering and Materials", SICHEM 2018, 6-7.09.2018, Universitatea Politehnica Bucuresti, Romania, Comunicare Orala - Fifere A., Lungoci A.L., Turin-Moleavin I.A., Petrovici A.R., Antioxidant loaded dextran coated magnetic nanoparticles for biomedical application.
2. „4th International Conference on Chemical Engineering", ICCE 2018, 31.10-02.11.2018, Iasi, Romania, Comunicare Orala –Lungoci A.L., Fifere A., Marangoci N., Corciova A., Ivanescu B., Tuchilus C., Mircea C., Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts.
3. "The 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 10th National Congress with International Participation", 6-10 iunie 2018, Craiova, Romania, poster- Fuior EV, Deleanu M, Voicu G, Rebleanu D, Constantinescu CA, Safciuc F, Simionescu M, Calin M. Preparation and characterization of endothelium-targeted flavonoid-loaded lipid nanoemulsions -**premiul I la sectiunea POSTERE.**
4. "International Conference on Nanotechnology and Bioscience", 23-29 septembrie 2018, Heraklion, Grecia – poster– Fuior EV, Voicu G, Deleanu M, Rebleanu D, Constantinescu CA, Safciuc F, Simionescu M, Calin M VCAM-1 targeted naringenin-loaded lipid nanoemulsions reduce monocyte adhesion to activated endothelial cells.
5. "Advances in proteomics and progress in precision medicine" 24-26 octombrie 2018, Bucuresti, Romania – poster, Fuior E.V., Voicu G., Deleanu M., Rebleanu D., Constantinescu C.A., Safciuc F., Simionescu M., Calin M, VCAM-1 targeted naringenin-loaded lipid nanoemulsions reduce monocyte adhesion to activated endothelial cells.

● Participarea la manifestari stiintifice nationale:

1. „A XXXV-a Conferinta Naţionala de Chimie", 02-06 octombrie 2018, Calimanesti-Caciulata, România, Deleanu M, Fuior E, Carnuta M, Stancu C, Toma L, Popa M, Sima A, Preparation and characterization of nanoemulsions encapsulating allicin extract from garlic.

● Lucrari ISI:

1. Manuscris in preparare, ce urmează a fi trimis spre publicare la revista „Current Pharmaceutical Design" având ca topic principal polifenolii și modalități de administrare inteligentă.

Concluzii:

Obiectivul etapei I a proiectului P3-INTERA a fost indeplinit in totalitate. Au fost realizate mai multe tipuri de nanoparticule magnetice cu capacitate de vectorizare (țintire) atât pe bază de magnetită sau magnetită acoperită cu polimeri (dextran și chitosan) și încărcate cu polifenoli sau uleiuri esențiale bogate în polifenoli. De asemenea, au fost obtinute si caracterizate nanoparticule lipidice carausi de polifenoli directionate catre molecule de adeziune exprimate pe suprafata endoteliului vascular activat. Au fost realizati următorii indicatori: **1** tehnologie de obtinere a nanoparticulelor de magnetita (NPM), **1** raport de caracterizare al acestora; **1 raport** de obtinere si caracterizare a nanoparticulelor lipidice, **1** tehnologie de obtinere a nanoparticulelor magnetice acoperite cu dextran, **1** raport de caracterizare al acestora; **1** tehnologie de obtinere a nanoparticulelor magnetice functionalizate cu polifenoli, **1** raport de sinteza; realizarea unui **model experimental functional** de separator (electro)magnetic vertical a nanoparticulelor izomagnetice; diseminarea rezultatelor prin participarea cu lucrari (poster sau prezentari orale) la **5 Conferinte Internationale;** angajarea unui tanar in IBPC "N. Simionescu" (Anghelache Maria) si organizarea concursului pentru ocuparea unui post de catre UPB (procedură in desfăsurare).

INTERA-4 (PROIECT nr. 4) Conjugati polimerici pentru inducerea eficienta a expresiei unor gene de interes cu aplicabilitate in terapia celulara

Etapa 2018 – Obtinerea si caracterizarea nanoparticulelor magnetice si conjugati polimerici cu invelis policationic de PEI pentru a fi folositi ca agenti de transfectie

Obiectivul etapei I a subproiectului **INTERA-4** a fost indeplinit in totalitate:
-S-a realizat documentatia pentru sinteza conjugatilor polimerici de tipul C60-PEI, siloxan-PEI, conjugați pe bază de scualenă si ciclodextrina precum si sinteza și funcționalizarea nanoparticulelor magnetice.
- Au fost obtinute plasmide folosite in studiile de transfectie cu conjugatii polimerici si nanoparticule magnetice: apoAI si apoAII in pcDNA 3.1 simplu, cu DYK si cu EGFP
-S-a realizat o Tehnologie de laborator cu privire la sinteza si caracterizarea structurala a nanoparticulelor magnetice NMP-PEI
- S-a realizat un Protocol de laborator cu privire la Caracterizarea morfologica si dimensionala a NMP-PEI, determinarea stabilitatii termice si a proprietatilor magnetice ale nanoparticulelor.
-Au fost formati poliplecsi NPM-PEI/ADN la rapoarte N/P crescatoare: 1, 10, 50, 100 si 200. Pentru caracterizarea poliplecsilor obtinuti, dimensiunea si potentialul zeta al poliplecsi NPM-PEI/ADN au fost determinate utilizand aparatul Nanosizer (Malvern).
- S-a testat citotoxicitatea NMP-PEI
- S-a intocmit un Raport experimental cu privire la functionalizarea scualenei PEGilate cu glutaraldehidă, in vederea conjugarii cu PEI si caracterizare structurala a acestora.
- S-a finalizat o metoda de cuplare covalenta a unor sisteme dinamice pe bază de scualenă PEGilată, glutaraldehidă și PEI 25kDa,
- S-a intocmit un Raport de caracterizare a sistemelor dinamice BF pe bază de squalenă, PEG și PEI

Diseminare:

- First Balkan Conference on Medical Mycology and Mycotoxicology Balkan Fungus 2018, 13-15.09.2018, Timișoara – Romania (Comunicare Orala), Pinteala M, *Strategies in designing polymers for transfection*,
- The 12th Central and Eastern European Proteomic Conference, Bucuresti, Romania, 24 - 26 Octombrie, 2018Bisphenol A down-regulates apolipoprotein A1 expression and exerts pro-atherogenic effects, Violeta Georgeta Trusca, Madalina Dumitrescu, Ioana Madalina Fenyo, Irina Florina Tudorache, Anca Violeta Gafencu
- First Balkan Conference on Medical Mycology and Mycotoxicology Balkan Fungus 2018, **13-15.09.2018**, Timișoara – Romania, Comunicare Orala –Peptanariu D., Uritu C.M., Ardeleanu R., Dascalu A.I., Clima L., Moleavin Turin I., Neamtu A., Pinteala M., Strategies in designing polymers for transfection

❖ **Diseminare: Activitatile de diseminare din aceasta faza a proiectului sunt mentionate la finalul raportarii fiecarui proiect component**

❖ **Prezentarea structurii ofertei de servicii de cercetare si tehnologice cu indicarea link -ului din platforma Erris**;

- Prin achizitionarea softului de Biologie Moleculara SnapGene, infrastructura IBPC s-a imbogatit astfel incat suntem acum capabili de a realiza servicii de design molecular si clonare. Acest serviciu a fost postat pe platforma ERRIS https://erris.gov.ro/Department-gene-analysis :Plasmid design and cloning strategies

❖ **Locuri de munca sustinute prin program, inclusiv resursa umana nou angajata**;

In cadrul proiectului INTERA au fost angajati urmatorii noi cercetatori:
- In **IBPCNS** (CO) toti cei 3 noi cercetatori propusi de angajat au fost angajati:
  - Laura Moise – INTERA-1
  - Mihaila Andreea Cristina– INTERA-2
  - Anghelache Maria – INTERA-3

-In **INCDFM (P1)** au fost angajati cei doi noi cercetatori propusi: Apostol Mariana Mihaela si Sandu Alexandra in INTERA-2
-In **UPB** este in desfasurare procedura de angajare.
-In **ICMPP** au fost angajate doi din cei 3 tineri cercetatori propusi: Natalia Simionescu (INTERA-4) si Rusu Alina Gabriela (INTERA-1). Este de mentionat faptul ca Rusu Alina Gabriela, a fost nevoita sa demisioneze din proiectul INTERA deoarece a castigat un proiect PD, iar legea nu ii permite remunerarea din proiecte mai mult de 8 ore pe zi, norma cu care era remunerate din proiectul INTERA.

RAPORTARE STIINTIFICA SI TEHNICA (RST)

PROIECT

TERAPII INTELIGENTE PENTRU BOLI NON-COMUNICABILE, BAZATE PE ELIBERAREA CONTROLATA DE COMPUSI FARMACOLOGICI DIN CELULE INCAPSULATE DUPA MANIPULARE GENETICA SAU BIONANOPARTICULE VECTORIZATE (INTERA)

Contract PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697

nr. 13PCCDI/2018
Faza II-2019

PROIECT INTERA-1

Incapsularea celulelor eucariote manipulate genetic pentru eliberarea controlată a unor produși farmacologici activi

Parteneri implicati:
CO: Institutul de Biologie și Patologie Celulară „ N. Simionescu", Bucuresti
P1: Universitatea Politehnica din Bucuresti
P2: Institutul De Chimie Macromoleculara "Petru Poni", Iași

Etapa 2019 – Obtinerea celulelor manipulate genetic incapsulate in matrici

În cadrul acestei etape au fost îndeplinite activitățile cu privire la optimizarea metodelor de sinteză ale microcapsulelor și microfibrelor polimerice prin procedeul de electrospinning si in camp electric, cât și caracterizările lor prin microscopie electronică de baleaj, spectroscopie FTIR, cât și cinetica de absorbție și analiza termică si analiza eliberarii compusilor. În cadrul microveziculelor, a fost optimizat procesul de obținere prin intermediul spinereților coaxiali, prin încapsularea de celule eucariote modificate genetic, cât și optimizarea incapsularii in camp electric. Capsulele au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic și morfologic. Dimensiunea microsferelor este in special controlata de potentialul aplicat, iar porozitatea de concentratia gelului de alginat utilizat in obtinerea microsferelor. Procesul de eliberare a compușilor activi a fost realizat initial pe o molecula model (albastru de metilen) care este usor de monitorizat şi conferă premisele ca sistemele dezvoltate să poată fi utilizaţi în eliberarea de compuşi de secreție celulele eucariote incapsulate in microsfere, profilul de eliberare fiind dependent de caracteristicile sistemului. De asemenea, a fost determinata secretia de IL-10 din celulele transfectate incapsulate. Capsulele obținute vor fi testate *in vivo* in etapa urmatoare.

S-au atins toti indicatorii de realizare:

-un studiul fizico-chimic privind caracterizarea microcapsulelor polimerice si microfibrelor
- un studiul al cineticii secretiei din celulele incapsulate
- Studiul secretiei peptidelor active din celulele incapsulate
- S-a elaborat si optimizat tehnologia obtinerii microveziculelor
- Studiul proprietatilor fizico-chimice, caracterizarea fizico-chimică și morfologică a micro-veziculelor încărcate cu celule eucariote

Activitățile de diseminare au fost îndeplinite prin doua lucrari stiintifice (una acceptata si una publicata), 7 participari la conferințe, elaborarea unei cereri de brevet care a fost bine primita de comunitatea academica, dovada fiind premiile obtinute la saloanele de inventii la care s-a participat.

Activitati de diseminare

D 1.1. Lucrari

1. G. Fundueanu, M. Constantin, S. Bucatariu, A. Nicolescu, P. Ascenzi, L.G. Moise, L. Tudor, V.G. Trusca, A.V. Gafencu, D. Ficai, A. Ficai, E. Andronescu**, Simple and dual cross-linked chitosan millicapsules as a particulate support for cell culture**, *Int. J. Biol. Macromol. 2019 (acceptata pentru publicat)*

2. Trusca VG, Fuior EV, Kardassis D, Simionescu M, Gafencu AV, The Opposite Effect of c-Jun Transcription Factor on Apolipoprotein E Gene Regulation in Hepatocytes and Macrophages, Int J Mol Sci. 2019 Mar 23;20(6). pii: E1471. doi: 10.3390/ijms20061471. PubMed PMID: 30909560; International Journal of Molecular Sciences – (Factor de Impact: 4.3)

D1.2. Conferinte

- G. Fundueanu**, Self-regulated drug delivery systems,** *21st Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 2019), 4-7 September 2019, Constanta, Romania.*
- "21st Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering"–RICCCE 21, unde au fost prezentate numeroase lucrari, printre care "Alginate beads loaded with cells and biologic active agents", Angela Spoială, Cornelia-Ioana Ilie, Denisa Ficai, Anton Ficai, Laura Moise, Violeta Trușcă, Roxana Doina Trușcă, Bogdan-Ștefan Vasile, Ovidiu Oprea, Anca Violeta Gafencu, Ecaterina Andronescu.
- "5th World Congress on New Technologies (NewTech'19) - Lisbon, Portugal – August 18-20, 2019 - Drug Delivery Platforms for Cardiovascular Applications based on Alginate-based Hollow Structures -

Angela Spoiala, Cornelia Ioana Ilie, Laura Moise, Ioana Lavinia Ardelean, Roxana Doina Trușcă, Bogdan Stefan Vasile, Denisa Ficai, Manuela Calin, Anca Violeta Gafencu, Anton Ficai, Ecaterina Andronescu.

- Laura G. Moise, Lavinia E. Tudor, Violeta G. Trusca, Anca V. Gafencu, "Interleukin-10 signal sequence cloned in front of the luciferase drives the reporter protein secretion", Simpozion aniversar IBPC "Nicolae Simionescu"- "O calatorie fascinanta de 40 de ani pentru descoperirea secretelor celulei in beneficiul sanatatii omului", 19-20 septembrie 2019, - **Poster**.
- Lavinia E. Tudor, Laura G. Moise, Violeta G. Trusca, Gheorghe Fundueanu, Sanda Bucatariu, Maya Simionescu, Anca V. Gafencu,"*The secretory potential of interleukin-10 by the encapsulated endothelial cells*", Simpozion aniversar IBPC "Nicolae Simionescu"- "O calatorie fascinanta de 40 de ani pentru descoperirea secretelor celulei in beneficiul sanatatii omului", 19-20 septembrie 2019, **Poster**.
- Lavinia E. Tudor, Laura G. Moise, Violeta G. Trusca, Gheorghe Fundueanu, Sanda Bucatariu, Maya Simionescu, Anca V. Gafencu, The secretory potential of interleukin-10 by the encapsulated endothelial cells, "Al 11-lea Congres National cu Participare Internațională si a 37-a Sesiune Științifica Anuala a Societății Romane de Biologie Celulara", Constanta, Romania- **Poster**.
- Laura G. Moise, Lavinia E. Tudor, Violeta G. Trusca, Maya Simionescu, Anca V. Gafencu, The addition of the signal sequence of interleukin-10 to the luciferase drives the reporter protein secretion, "Al 11-lea Congres National cu Participare Internațională si a 37-a Sesiune Științifica Anuala a Societății Romane de Biologie Celulara", Constanta, Romania- **Poster**.

D1.3. Un serviciu ERRIS - Ionic polysaccharide-based microcapsules as matrix for cell encapsulation.

D1.4. CURSURI

Scoala de vara "Nanoparticule inteligente pentru livrarea directionată de compuși bioactivi: preparare, caracterizare si aplicații". Cursanti: Gheorghe Fundueanu-Constanin; Mihail Lupei

BREVETE

- Denisa Ficai, Andreea Iliev, Anton Ficai, Violeta Georgeta Trușcă, Anca Violeta Gafencu, Sanda-Maria Bucătariu, Gheorghe Fundeanu-Constantin, Maya Simionescu, Ecaterina Andronescu - Vezicule și tuburi polimerice și tehnologie de obținere a acestora. A 01054/ 05.12.2018 înregistrat la OSIM.

Activitățile de diseminare și exploatare a rezultatelor au fost puse în valoare prin recunoașterea internațională obținută la saloanele de invenții interne și internaționale. Cererea de brevet sus-menționată a premiată de Juriul International al saloanelor si de delegațiile unor state *după cum urmează*:

În cadrul Expoziției Internaționale Specializate -INFOINVENT 20-23 noiembrie 2019, Chișinău s-au acordat următoarele premii:

- Medalia de Aur acordată de Universitatea Tehnică a Moldovei
- Diplomă de Excelență & Trofeul Group Mechatron acordată de Mecatronică & Cyber - MixMecatronică pentru Viitor
- Medalia de Aur acordată de Agenția de Stat
- Diplomă de Excelență acordată de Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu" din Republica Moldova

În cadrul celei de-a „11th Edition European Exhibition of Creativity and Innovation" - EUROINVENT 16-18 mai 2019, Iași s-au acordat următoarele premii:

- Diploma of Gold Medal acordată de Ministerul Cercetării și Inovării
- Diplomă Prize acordată de către „Alexandru Ioan Cuza" University of Iași
- Gold Medal acordată de „Carol Davila" University of Medicine and Pharmacy Bucharest
- Excellence Award & Gold Medal acordate de către Asociația Română de PTERIDOLOGIE
- Excellence Award & Gold Medal acordate de către National Institute for Research & Development in Chemistry and Petrochemistry -ICECHIM
- Special Prize acordat de către Romanian Association for Alternative Technologies A.R.T.A Sibiu

IDEA-EXPO 2019 IDEA, Novelty, Inovation, Art and Crafts International Exhibition and Fair, 06-07 April 2019, Szolnok, Hungary acordă premiul: Diploma Invention -Creation

- Una dintre lucrările prezentate la conferințe a fost de asemenea distinsă la INSPCNN 2018 cu premiul Best Presentation Award:"20th International Conference on Synthetic polymer Chemistry, Nanoscience and Nanotechnology- INSPCNN 2018"- Certificate of Best Presentation Award for the paper "Synthesis and Characterization of Some Alginate Hallow Fibres Using Co-Axial Needles", Anton Ficai, Ioana Lavinia Ardelean, Roxana Doina Trușcă, Bogdan Stefan Vasile, Denisa Ficai, Ecaterina Andronescu.

PROIECT nr. 2

Etapa 2019 - Realizarea unor matrici 3D cu structura similara cu a foitei valvulare functionalizate cu senzor de oxygen

CO: Institutul de Biologie si Patologie Celulara „ N. Simionescu", Bucuresti

P1: INCD Fizica Materialelor

P2: Institutul De Chimie Macromoleculara "Petru Poni", Iasi

Obiectivul etapei a II a proiectului P2-INTERA a fost indeplinit in totalitate:

(i) Au fost obtinute hidrogeluri, criogeluri si matrici 3D biocompatibile cu celulele umane valvulare, care au permis cultivarea si proliferarea celulelor cu morfologie corespunzatoare tipului celular respectiv;

(ii) Morfologia criogelurilor si a hidrogelurilor a fost studiata prin microscopie SEM, in vederea determinarii dimensiunilor porilor stucturilor 3D dezvoltate;

(iii) Scaffoldurile electrofilate din PMMA cat si cele din PCL au fost acoperite cu metale, aur si argint, in vederea utilizării lor pentru cuantificarea oxigenului dizolvat prin tehnici electrochimice;

(iv) Au fost fabricate doua celule electrochimice necesare măsurătorilor electrochimice pentru determinarea nivelul de O_2 dizolvat, utilizând ca senzori fibrele polimerice acoperite cu Au si Ag.

(v) Analiza comparativa a fenotipului celulelor interstitiale valvulare expuse conditiilor pro-inflamatorii (LPS) in cultura 2 versu 3D a aratat ca celulele interstitiale valvulare (VIP) cultivate pe membranele elctrofilate prezinta un fenotip quiescent, asemanator cu VIC din valvele *in vivo* in conditii normale, spre deosebire de VIC cultivate in conditii 2D care prezinta fenotip activat, pro-inflamator.

(vi) A fost organizat un workshop, a fost realizata pagina web INTERA, au fost efectuate participari la manifestari stiintifice, a fost realizat un brevet si o lucrare stiintifica, iar alta a fost trimisa spre publicare.

Diseminarea si valorificarea rezultatelor cercetarii prin crearea unei pagini web si participari la manifestari stiintifice, publicatii stiintifice, brevetare.

Indicatori de realizare:

***1.* Articole publicate in reviste cotate ISI:**

D. Rusu, D. Ciolacu, B.C. Simionescu. Cellulose-based hydrogels in tissue engineering applications *Cellulose Chem. Technol*., 53(9-10), 907-923 (2019).

2. Lucrari trimise spre publicare:

D. Ciolacu, R. Nicu. Cellulose-based scaffolds in heart valves tissue engineering. *Cells* (2019).

3. Lucrari publicate integral in volumul manifestarilor stiintifice: 1

D. Ciolacu, A.R. Petrovici, A.C. Mihaila, E. Butoi. Cellulose-dextran hydrogels in heart valve tissue engineering; *The 23th International Conference of Inventics "INVENTICA 2019"*, 27 June 2019, Iasi, Romania, 77-84 (2019).

4. Conferinte/Comunicari orale:

1. D. Ciolacu, A.R. Petrovici, G. Pricope-Gavrila, R. Nicu. Hydrogels in heart valve tissue engineering application; Workshop "*Progrese recente in domeniul obtinerii de bio-matrici in ingineria valvei aortice*", Bucuresti, 22 mai (2019).

2. A Mihaila, M Vadana, M Bacalum, M Raileanu, L Ciortan, L Caciun, TR Esanu, I Manduteanu, Elena Butoi. Effects of low-dose proton radiation on oxidative stress produced in endothelial and epithelial cells."The 37th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 11th National Congress with International Participation", Constanța, România, 20-23 iunie, 2019-Poster.

3. Apostol MM, Matei E, Enache A, Barsan MM, Dicuescu V, Enculescu I. Graphene growth by chemical vapor deposition for (bio)sensing applications. World Congress on Functional Materials and Nanotechnology, May 13-14, 2019, Valencia, Spain

4. D. Ciolacu, A.R. Petrovici, A.C. Mihaila, E. Butoi. Cellulose-dextran hydrogels in heart valve tissue engineering; *The 23th International Conference of Inventics "INVENTICA 2019"*, 27 June 2019, Iasi, Romania (2019).

5. D. Ciolacu, A.R. Petrovici, R. Nicu. Hydrogels based on cellulose-dextran for controlled drug release; *The* 13th *Internat Symposium of Cosmetic and Aromatic Products*, Iasi, Romania, 4-7 June (2019).

6. A.R. Petrovici, F. Doroftei, D. Ciolacu. Synthesis of bio-cryogels for tissue engineering applications; *The 13th Internat. Symposium of Cosmetic and Aromatic Products*, Iasi, Romania, 4-7 June (2019).

7. D. Ciolacu. Cellulose-based superabsorbent hydrogels; *The 23th International Exhibition of Inventics "INVENTICA 2019"*, 26-28 June 2019, Iasi, Romania (2019).
8. R. Nicu, A.R. Petrovici, A.C. Mihaila, Elena Butoi, Diana Ciolacu. Constructii tri-dimensionale cu aplicatii in ingineria tisulara a valvelor aortice; *A 27-a Sesiune de Comunicari Stiintifice „Progrese in stiinta compusilor organici si macromoleculari"*, Iasi, 2-4 octombrie (2019).

5. Organizare Workshop:

1. *WORKSHOP*: "*Progrese recente in domeniul obtinerii de bio-matrici in ingineria valvei aortice*"; Institutul de Biologie si Patologie Celulara „N. Simionescu", Bucuresti, 22 mai (2019).

6. Cerere de brevet:

1. *Procedeu si compozitie pentru obtinerea unor materiale pe baza de exopolizaharide cu potentiale aplicatii in ingineria tisulara a valvelor aortice*; Diana E. Ciolacu, Anca R. Petrovici, Andreea C. Mihaila, Elena Butoi; Cerere de brevet OSIM (trimis spre examinare).

7. Premii ale societatilor stiintifice nationale obtinute prin procese de selectie: 3

1. Cellulose-based superabsorbent hydrogels; D. Ciolacu; The 23th International Exhibition of Inventics "INVENTICA 2019", 26-28 June 2019, Iasi, Romania – *Diploma of Honour*, Medal INVENTICA 2019.
2. Cellulose-based superabsorbent hydrogels; D. Ciolacu; The 23th International Exhibition of Inventics "INVENTICA 2019", 26-28 June 2019, Iasi, Romania – *Diploma of the Politehnica Innovation Award 2019*, University Politehnica of Bucharest.
3. Cellulose-based superabsorbent hydrogels; D. Ciolacu; The 23th International Exhibition of Inventics "INVENTICA 2019", 26-28 June 2019, Iasi, Romania – *Diploma of Special Prize 2019*, Romanian Association for Alternative Technologies, A.R.T.A. Sibiu.

PROIECT nr. 3

Nanobioparticule inteligente concepute pentru vectorizarea compusilor bioactivi pentru terapia inflamatiei vasculare

Etapa 2019 – Investigarea in vitro a proprietatilor si efectelor terapeutice ale nanobioparticulelor incarcate/functionalizate cu polifenoli

Parteneri:
CO: Institutul de Biologie si Patologie Celulara „ N. Simionescu", Bucuresti
P1: Universitatea Politehnica din Bucuresti
P2: Institutul De Chimie Macromoleculara "Petru Poni", Iasi

Obiectivul etapei 2 a proiectului P3-INTERA a fost indeplinit in totalitate. Au fost indepliniți toți indicatorii de realizare propusi, si anume: **1** model optimizat de nanoparticule magnetice pentru transportul terapeutic de polifenoli, **1** raport de caracterizare a profilului de eliberare a polifenolilor din structura nanoparticulelor magnetice in medii biologice, **1** raport de caracterizare a stabilitatii nanoparticulelor lipidice in medii biologice, **1** raport de caracterizare a citotoxicitatii celor doua tipuri de nanoparticule incarcate cu polifenoli, **1** model experimental de matrici polimerice cu nanoparticule magnetice inglobate si **1** Raport de sinteza a acestora, **1** model experimental pentru urmarirea efectelor terapeutice ale polifenolilor, **1** raport de caracterizare a efectelor anti-inflamatoare ale nanoparticulelor incarcate cu polifenoli, **diseminarea rezultatelor** prin participarea cu lucrari la **Conferinte Nationale (7** prezentări orale si **2** postere) si **Internationale (1** prezentare orala si **6** postere**), publicarea a doua articole in reviste cotate ISI si un capitol de carte** in curs de publicare**,** organizarea unei **scoli de vara, 1 cerere de brevet** si actualizarea **paginii web** a proiectului.

Diseminarea si valorificarea rezultatelor cercetarii

Indicatori de realizare: actualizare pagina web a proiectului, minim 4 participari la congrese nationale/internationale, 1 cerere brevet, organizarea unei scoli de vara.

● A fost actualizata pagina web a proiectului care poate fi gasita la adresa: http://www.icbp.ro/static/en/en-networking_grants-grants-national_grants/intera.html

● Aplicația de brevet A/01055/05.12.2018 cu titlul: „Separator (electro)magnetic vertical a nanoparticulelor izomagnetice” a fost înregistrată la OSIM inca de la sfarsitul anului 2018 pentru protejarea drepturilor de proprietate intelectuala in vederea diseminarii ulterioare a rezultatelor.

Brevetul a obtinut urmatoarele **premii** la Saloanele de inventica:

1) International Salon for Scientific Research, Innovation and Inventions, “ProInvent”, 20-22 March 2019, Cluj Napoca, Romania

- Premiu special acordat de Corneliu Group

- Premiu special acordat de Romanian Association for Alternative Technologies

2) 11th Edition of EUROINVENT- European Exhibition of Creativity and Innovation, 16-18 may 2019, Iași, Romania

- Medalia de aur acordată de EUROINVENT
- Innovation Award acordat de Asociația Română de PTERIDOLOGIE
- Innovation Award acordat de Universitatea de medicină și farmacie „CAROL DAVILA”
-Innovation Award acordat de Universitatea de științe agronomice și medicină veterinară din București
- Innovation Award acordat de NIRD URBAN – INCERC

3) IDEA-EXPO 2019 IDEA, Novelty, Invention, Art and Crafts International Exhibition and Fair, 06-07 April 2019, Szolnok, Hungary

- Diploma Invention - Creation

4) Expoziția Internațională Specializată „INFOINVENT”- Ediția a XVI-a, 20-23 Noiembrie 2019, Chișinău, Republica Moldova

- Diplomă de excelență cu medalie acordat de Universitatea de stat de medicină și farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova
- Medalia de aur acordate de Agenția de stat pentru proprietatea intelectuală a Republicii Moldava

Link interviu TV Moldova, (minutul 22:00): http://trm.md/ro/mesager/mesager-din-20-noiembrie-2019

● A fost organizata Scoala de Vară “Nanoparticule inteligente pentru livrarea directionată de compuși bioactivi: preparare, caracterizare si aplicații”, 23-24 mai 2019, Bucuresti (programul scolii de vara a fost postat pe pagina web a proiectului). Scoala de Vara a oferit o imagine de ansamblu în folosirea nanoparticulelor inteligente pentru livrarea compușilor bioactivi, acoperind fundamentele formării și stabilității nanoparticulelor organice și anorganice, împreună cu metode de caracterizare a acestora și folosirea lor pentru transportul direcționat. Cursurile teoretice au furnizat informații despre diferite tipuri de nanoparticule inteligente, inovatoare pentru livrarea de medicamente, tehnologiile de încapsulare și tehnicile de caracterizare a nanoparticulelor, ce au fost urmate de o serie de demonstrații practice în laboratoarele din Universitatea POLITEHNICA din București.

● **17 Participari la manifestari stiintifice nationale/internationale (9** participari la manifestari nationale:7 prezentari orale si 2 postere**, 7** participari la manifestari internationale: 1 prezentari orala si 6 postere)

- **Participari la manifestari stiintifice nationale:**

1) Manuela Călin, Folosirea nanoparticulelor lipidice pentru transportul directionat de agenti terapeutici la peretele vascular, Școala de Vară INTERA 3 “Nanoparticule inteligente pentru livrarea direcționată de compuși bioactivi: preparare, caracterizare, aplicații”, Bucureşti, România, 23-24 mai, 2019-**Prezentare orală.**

2) Elena-Valeria Fuior, Reducerea activării endoteliului cu ajutorul nanoemulsiilor lipidice încărcate cu polifenoli, Școala de Vară INTERA 3 “Nanoparticule inteligente pentru livrarea direcționată de compuși bioactivi: preparare, caracterizare, aplicații”, Bucureşti, România, 23-24 mai, 2019- **Prezentare orală**.

3) Daniela Rebleanu, Tehnici de obținere și caracterizare a nanoparticulelor lipidice direcționate specific, Școala de Vară INTERA 3 “Nanoparticule inteligente pentru livrarea direcționată de compuși bioactivi: preparare, caracterizare, aplicații”, Bucureşti, România, 23-24 mai, 2019-**Prezentare orală**.

4) Anca Petrovici, Nanoparticule de oxid de fier acoperite cu dextran biosintetizat ca platforma pentru transportul polifenolilor, Școala de Vară INTERA 3 “Nanoparticule inteligente pentru livrarea direcționată de compuși bioactivi: preparare, caracterizare, aplicații”, Bucureşti, România, 23-24 mai, 2019- **Prezentare orală**.

5) Adrian Fifere, Nanoparticule magnetice folosite ca sisteme de transport a compusilor bioactive, Școala de Vară INTERA 3 "Nanoparticule inteligente pentru livrarea direcționată de compuși bioactivi: preparare, caracterizare, aplicații", Bucureşti, România, 23-24 mai, 2019- **Prezentare orală**.

6) Anton Ficai, Denisa Ficai, Obtinerea si caracterizarea nanoparticulelor magnetice; nanoformulari cu polifenoli, Școala de Vară INTERA 3 "Nanoparticule inteligente pentru livrarea direcționată de compuși bioactivi: preparare, caracterizare, aplicații", Bucureşti, România, 23-24 mai, 2019- **Prezentare orală**.

7) Cornelia Ioana Ilie, Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor magnetice acoperite cu polizaharide Școala de Vară INTERA 3 "Nanoparticule inteligente pentru livrarea direcționată de compuși bioactivi: preparare, caracterizare, aplicații", Bucureşti, România, 23-24 mai, 2019- **Prezentare orală**.

8) Fuior E.V., Deleanu M., Constantinescu C. A., Rebleanu D., Voicu G., Simionescu M., Calin M. "Flavonoids-loaded lipid nanoemulsions protect against endothelial inflammation by a mechanism involving NF-KB transcription factor and MCP-1 chemokine", Al 11 lea Congres National cu participare internationala si a 37a sesiune anuala a Societatii Romane de Biologie Celulara (sub egida Academiei Romane), 20-23 iunie 2019, Constanta, Book of Abstracts p. 128- **Poster**.

9) Fuior E.V., Voicu G., Deleanu M., Rebleanu D., Constantinescu C.A., Safciuc F., Simionescu M., Călin M., VCAM-1 targeted flavanone-loaded lipid nanoemulsions exert anti-inflammatory effects on activated endothelial cells – Simpozion aniversar IBPC „O călătorie fascinantă de 40 de ani pentru descoperirea secretelor celulei în beneficiul sănătății omului"/"An incredible 40-year journey to uncover cell's secrets for the benefit of human health", 19-20 septembrie 2019, Bucuresti, - **Poster**.

- Participari la manifestari stiintifice internationale:

1) Manuela Călin, P-selectin targeted nanocarriers are efficient drug delivery systems to activated endothelium, "3rd Edition of Global Conference on Pharmaceutics and Drug Delivery Systems (PDDS 2019)", Paris, Franta, 24-26 iunie, 2019 – invited speaker, **comunicare orala**.

2) Fuior E.V., Voicu G., Deleanu M., Rebleanu D., Constantinescu C. A., Safciuc F., Simionescu M., Calin M.: *VCAM-1 targeted flavanone-loaded lipid nanoemulsions exert anti-inflammatory effects on activated endothelial cells,* BAHH2 Workshop "Modern Biotechnological Advances for Human Health" organizat de INCDSB si International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, 28-31mai 2019, Bucuresti, Book of Abstracts p.75, **Poster**.

3) Vasincu I., Apotrosoaei M., Vasincu A., Petrovici A.R., Profire L., Constantin S., The development of chitosan nanoparticles using ionic gelation method, 9th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Valahia University of Targoviste, Targoviste, Romania, 8 - 11 Mai, 2019, **Poster**.

4) Maria Anghelache, Cornelia-Ioana Ilie, Denisa Ficai, Anton Ficai, Manuela Calin, Cytotoxicity evaluation of polyphenol-loaded magnetic nanoparticles on human endothelial cells, "Achievements and Perspectives of Modern Chemistry", Chișinău, Republica Moldova, 9-11 octombrie, 2019-**Poster**.

5) Mariana Deleanu, Elisabeta E. Popa, Mihaela Carnuta, Mona E. Popa, Composition, antioxidant and antifungal activity of wild oregano (origanum vulgare) essential oil, "Achievements and Perspectives of Modern Chemistry", Chișinău, Republica Moldova, 9-11 octombrie, 2019-**Poster.**

6) Cornelia-Ioana Ilie, Angela Spoiala, Denisa Ficai, Anton Ficai, Adrian Ionut Nicoara, Bogdan Stefan Vasile, Vasile-Adrian Surdu, Maria Anghelache, Manuela Calin, Ecaterina Andronescu, *Synthesis and characterization of a new polysaccharide-coated magnetic nanoparticles*, "21st Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE)", Mamaia-Constanța, România, 4-7 septembrie, 2019-**Poster**.

7) Cornelia Ioana Ilie, Angela Spoiala, Laura Moise, Maria Anghelache, Denisa Ficai, Ioana Lavinia Ardelean, Roxana Doina Trusca, Anton Ficai, Manuela Calin, Anca Gafencu, Ecaterina Andronescu, *Smart alginate-based magnetic platforms for drug delivery*, 5th World Congress on New Technologies (NewTech'19) - International Conference on Nanotechnology. Fundamentals and Applications (INCFA), Lisabona, Portugalia în perioada 18-20 august 2019- **Poster**.

● Articole publicate in reviste ISI

1) Fuior EV, Deleanu M, Constantinescu CA, Rebleanu D, Voicu G, Simionescu M, Calin M. Functional Role of VCAM-1 Targeted Flavonoid-Loaded Lipid Nanoemulsions in Reducing Endothelium

Inflammation. Pharmaceutics. 2019; 11(8). pii: E391.doi: 10.3390/pharmaceutics11080391. PMID: 31382634, factor de impact 4.773.

2) Antioxidant, antimicrobial and photocatalytic activities of silver nanoparticles obtained by bee propolis extract assisted biosynthesis; A. Corciova, C. Mircea, A. F. Burlec, O. Cioanca, C. Tuchilus, A. Fifere, A. L. Lungoci, N. Marangoci, M. Hancianu; *Farmacia*, 67, 482-489 (2019), factor de impact 1.527.

● **Capitole în monografii:** Fuior EV, Calin M (2019), Nanoparticle-based delivery of polyphenols for the treatment of inflammation-associated diseases. In Book: Advances and Avenues in development of novel carriers for Bioactives and biological agents, Editors: Manju Rawat Singh, Deependra Singh, Jagat Kanwar, Nagendra Singh Chauhan, in curs de publicare. https://www.elsevier.com/books/advances-and-avenues-in-the-development-of-novel-carriers-for-bioactives-and-biological-agents/singh/978-0-12-819666-3

PROIECT nr. 4

Conjugati polimerici pentru inducerea eficienta a expresiei unor gene de interes cu aplicabilitate in terapia celulara

CO: Institutul de Biologie si Patologie Celulara „ N. Simionescu", Bucuresti

P1: Institutul De Chimie Macromoleculara "Petru Poni", Iasi

Etapa 2019 – Investigarea in vitro a citotoxicitatii si eficientei de transfectie a NPM-PEI

În cadrul etapei 2, proiect component INTERA 4 a fost determinata citotoxicitatea si randamentul de transfectie a NPM-PEI, au fost amplificate plasmidele codificatoare pentru apoAI si apoAII si IL-10, au fost functionalizati agenti de transfectie CORE-PEI cu diferite molecule pentru creșterea ratei transfecției (CORE-PEI-R), a fost determinat raportul optim de complexare conjugate CORE-PEI sau CORE-PEI-R cu ADN care au fost testate pentru evaluarea citotoxicitatii si a randamentului de transfectie.

Obiectivul etapei 2 a proiectului P4-INTERA a fost indeplinit in totalitate. Au fost indepliniți toți indicatorii de realizare propusi, si anume: **1 raport experimental** de testare in vitro a randamentului de transfectie a NPM-PEI, **1 raport de sinteza** pentru functionalizarea agentilor de transfectie CORE-PEI cu diferite molecule pentru: penetrare membranara/nucleara, recunoastere celulara, cresterea biocompatibilitatii, CORE-PEI-R, **3 plasmide** codificatoare pentru ApoAI, ApoAII si IL-10 amplificate, **1 protocol de obtinere** a complexelor CORE-PEI si a CORE-PEI-R cu acizi nucleici, **1 raport de biocompatibilitate si randament de transfectie a** compusilor CORE-PEI si CORE-PEI-R, **diseminarea rezultatelor** prin participarea cu lucrari la 5 **Conferinte Nationale (2** postere) si **Internationale (3** postere**), publicarea a doua articole** in reviste cotate ISI**, 1 articol acceptat** spre publicare in revista ISI **si 1 articol trimis** spre publicare**.**

Diseminarea si valorificarea rezultatelor cercetarii

Indicatori de realizare: *Participarea la minim 2 manifestari nationale/internationale, 1 lucrare ISI*

●Participari la manifestari stiintifice nationale/internationale

-Hemp-extracted cannabidiol: Activation and in vitro anticancer effect; A.R. Petrovici, N. Simionescu, V. Paraschiv, M. Pinteala, M. Silion; 2nd Food Chemistry Conference: Shaping the Future of Food Quality, Safety, Nutrition and Health; Seville, Spain, 17-19 September, 2019- **Poster**.

- Cristina Ana Constantinescu, Daniela Rebleanu, Geanina Voicu, Mariana Deleanu, Ileana Manduteanu, Virginie Escriou, Maya Simionescu, Manuela Calin, Simulated blood flow to study interaction specificity of P-selectin targeted nanocarriers in vitro, "JRC Summer School on Non-Animal Approaches in Science. Challenges and future directions", Ispra, Italia, 21-24 mai, 2019-Poster.

● Articole publicate in reviste ISI

- Duodenoscope-associated infections beyond the elevator channel: alternative causes for dificult reprocessing; G.G. Balan, I. Rosca, E.-L. Ursu, A. Fifere, C.-D. Varganici, F. Doroftei, I.-A. Turin-Moleavin, V. Sandru, G. Constantinescu, D. Timofte, G. Stefanescu, A. Trifan, C.V. Sfarti; Molecules 24, 2343 (2019)
- Moraru AC, Rosca I, Craciun B, Nicolescu A, ChiriacAE, Voicu V, 2019. Insights of the antimicrobial activity of piperine extracted from Piper negrum L, Farmacia (IF 1,528)- acceptat spre publicare.
- Violeta G. Trusca, Madalina Dumitrescu, Ioana M. Fenyo, Irina F. Tudorache, Maya Simionescu and Anca V. Gafencu, The mechanism of Bisphenol A atherogenicity involves apolipoprotein A-I downregulation through NF-κB activation. Lucrarea este in revizie pentru publicare la International Journal of Molecular Sciences – (Factor de Impact: 4.3)

RAPORTARE STIINTIFICA SI TEHNICA (RST)

PROIECT

TERAPII INTELIGENTE PENTRU BOLI NON-COMUNICABILE, BAZATE PE ELIBERAREA CONTROLATA DE COMPUSI FARMACOLOGICI DIN CELULE INCAPSULATE DUPA MANIPULARE GENETICA SAU BIONANOPARTICULE VECTORIZATE

(INTERA)

Contract PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697

nr. 13PCCDI/2018

Faza III-2020

PROIECT INTERA-1

Incapsularea celulelor eucariote manipulate genetic pentru eliberarea controlată a unor produsi farmacologici activi

Parteneri implicati:
IC: Universitatea Politehnica din Bucuresti
P1: Institutul de Biologie și Patologie Celulară „ N. Simionescu", Bucuresti
P2: Institutul De Chimie Macromoleculara "Petru Poni", Iași

Etapa 2020 – Testarea capacității de secreție a peptidelor active a celulelor încapsulate

În cadrul acestei etape au fost realizate activitățile programate, atât cele cu privire la realizarea capsulelor cat si la studiul secretiei si difuziei moleculelor prin capsule. Capsulele prezinta caracteristici importante (viabilitate celulara, capacitate de difuzie a moleculelor secretate) si se vor putea utiliza in experimentele din etapa viitoare, in modele animale. In acest an au fost revizuite si publicate 2 articole in reviste ISI si au fost realizate 3 comunicari stiintifice.

- Activitati de diseminare

Indicatori de realizare: Pregatire si trimitere cerere brevet; - Brevetul a fost trimis inca din prima etapa a proiectului, deci indictorul a fost realizat.
Un serviciu nou a fost afisat in platforma ERRIS (Incapsulare celulara) - https://eeris.eu/ERIF-2000-000H-0593. A fost mentinata procurarea aparaturii de incapsulare din proiectul INTERA1.

Lucrari publicate in reviste ISI:

1. Simple and dual cross-linked chitosan millicapsules as a particulate support for cell culture. Fundueanu G, Constantin M, Bucatariu S, Nicolescu A, Ascenzi P, Moise LG, Tudor L, Trusca VG, Gafencu AV, Ficai D, Ficai A, Andronescu E. Int J Biol Macromol. 2020 Jan 15;143:200-212. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.045. PMID: 31816371 (Factor de impact:4.78 – Q1).
2) An efficient method for adenovirus production, Madalina Dumitrescu, Violeta G. Trusca, Ioana M Fenyo, A.V. Gafencu – lucrare acceptata la JoVE (Factor de impact 1.3 – Q2)

Comunicari orale

1. Pectin beads for cell encapsulation; M. Lupei, M. Constantin, I. Popescu*; International Congress of the "Apollonia" University of Iasi "By promoting excellence, we prepare the future"* XXX-th Edition, Iasi, Romania, 27 Februarie - 1 Martie 2020
2. New amphiphilic polysaccharide for advanced biomaterials; D.M. Suflet; *International Congress of the "Apollonia" University of Iasi "By promoting excellence, we prepare the future"* XXX-th Edition, Iasi, Romania, 27 Februarie - 1 Martie 2020
3. Intelligent micro-vehicles for drug transport and controlled release to cancer cells; G. Fundueanu, M. Constantin; *The 5-th International Conference on Chemical Engineering (ICCE 2020)*, Iasi, Romania, 28 – 30 Octombrie 2020

Etapa 2020 - Realizarea unei bio-matrici 3D cu structura similara cu a foitei valvulare cu celule incapsulate prin electrofilare

CO: Institutul de Biologie si Patologie Celulara „ N. Simionescu", Bucuresti
P1: INCD Fizica Materialelor
P2: Institutul De Chimie Macromoleculara "Petru Poni", Iasi

Obiectivul etapei a III-a a proiectului P2-INTERA a fost indeplinit in totalitate, atat obiectivele fazei 3, cat si livrabile prevazute fiind realizate in totalitate.

Diseminarea si valorificarea rezultatelor cercetarii

https://onedrive.live.com/?authkey=%21ApgpVWlK%5FvVymYc&id=34DF5A3D6499FBF3%21734&cid=34DF5A3D6499FBF3

Lucrari publicate: 4

1. Ciortan L, Macarie RD, Cecoltan S, Vadana M, Tucureanu MM, Mihaila AC, Droc I, Butoi E, Manduteanu I. Chronic High Glucose Concentration Induces Inflammatory and Remodeling Changes in Valvular Endothelial Cells and Valvular Interstitial Cells in a Gelatin Methacrylate 3D Model of the Human Aortic Valve. Polymers (Basel). 2020 Nov 25;12(12):E2786.

2. Cellulose-based hydrogels as sustained drug delivery systems, D. Ciolacu, R. Nicu, F. Ciolacu, *Material* 13(22), 5270, 1-37 (2020).

3. Serban A, Evanghelidis A, Onea M, Diculescu V, Enculescu I, Barsan MM, Electrospun conductive gold covered polycaprolactone fibers as electrochemical sensors for O2 monitoring in cell culture media, Electrochemistry Communications,Volume 111, 2020,https://doi.org/10.1016/j.elecom.2020.106662.

4. Vadana M, Cecoltan S, Ciortan L, Macarie RD, Tucureanu MM, Mihaila AC, Droc I, Butoi E, Manduteanu I. Molecular mechanisms involved in high glucose-induced valve calcification in a 3D valve model with human valvular cells. J Cell Mol Med. 2020 Jun;24(11):6350-6361.

Capitole de carti: 4

1. D. Rusu, D. Ciolacu, Cellulose-based hydrogels: design, structure-related properties and medical applications, in Pulp Production and Processing High-Tech Applications, Ed V.I.Popa, De Gruyter, Walter de Gruyter GmbH, Berlin, Germany, chapter 10, pp. 287–316 (2020).
2. D. Ciolacu, V.I. Popa, Nanocelluloses: preparations, properties and applications in medicine, in Pulp Production and Processing High-Tech Applications, Ed. V.I.Popa, De Gruyter, Walter de Gruyter GmbH, Berlin, Germany, chapter 11, pp. 317–340 (2020).
3. D. Ciolacu, Sustainable hydrogels from renewable resources, in Sustainability of biomass through bio-based chemistry, Ed. V.I. Popa, Editura CRC Press, Taylor and Francis Group, chapter 6 (2020).
4. R. Nicu, D. Ciolacu, Bio-based stimuli-responsive hydrogels with biomedical applications, in Sustainability of biomass through bio-based chemistry, Ed. V.I. Popa, Editura CRC Press, Taylor and Francis Group, chapter 9 (2020).

Conferinte: 2

1. Congresso Online Nacional de Quimica Analitica e Ambiental/ prezentare orala/ Newly synthesized micro- and nano- materials for electroanalysis/2020
2. "Newly synthesized micro- and nano- materials for electroanalysis" M.M. Barsan, V.C. Diculescu, I. Enculescu, A. Evanghelidis, E. Matei, M. Enculescu, A., Aldea, R.J. Branco Leote, G.E. Stan, N. Apostol International Workshop of Materials Physics - „Materials and structures for bio-applications", 21 September 2020, Magurele, Romania.

Postere: ydrogels based on exopolysaccharides biosynthesis by lactic acid bacteria strain, D. Ciolacu, A. R. Petrovici, A. C. Mihaila, E. Butoi, The 24th International Exhibition of Inventics "INVENTICA 2020", Iasi, Romania, 29-31 July (2020).

Premii ale societatilor stiintifice nationale obtinute prin procese de selectie: 1 Hydrogels based on exopolysaccharides biosynthesis by lactic acid bacteria strain, D. Ciolacu, A.R. Petrovici, A.C. Mihaila, E. Butoi, Diploma of Honor and Medal INVENTICA 2020, Iasi, Romania, 29-31 July (2020).

Serviciu platforma ERRIS: 1 (https://eeris.eu/ERIF-2000-000R-0336)

PROIECT nr. 3

Nanobioparticule inteligente concepute pentru vectorizarea compușilor bioactivi pentru terapia inflamației vasculare

Parteneri:

CO: Institutul de Biologie si Patologie Celulara „ N. Simionescu", Bucuresti
P1: Universitatea Politehnica din Bucuresti
P2: Institutul De Chimie Macromoleculara "Petru Poni", Iasi

Etapa 2020 – Validarea preclinică a nanobioparticulelor încărcate cu polifenoli

În cadrul etapei 3, proiect component INTERA 3 a fost evaluată biocompatibilitatea nanobioparticulelor lipidice prin testarea efectului diferitelor concentrații asupra integrității eritrocitelor, s-a urmărit distribuția nanoparticulelor lipidice încărcate cu polifenoli, direcționate specific către ținte moleculare exprimate pe suprafața endoteliului activat, în diferite organe, după administrarea intravenoasă a acestora intr-un model animal cu inflamatie vasculară sistemică și a fost determinată concentrația de polifenoli transportată la situsurile vizate cu ajutorul nanoparticulelor.

Obiectivul etapei 3 a proiectului P3-INTERA a fost indeplinit in totalitate. Au fost indepliniți toți indicatorii de realizare propusi, si anume: **1** raport de caracterizare a biocompatibilității nanobioparticulelor, **1** Raport de analiza a localizarii nanoparticulelor în diferite organe, **1** raport de analiză a concentrației de polifenoli transportată la situsurile vizate cu ajutorul nanoparticulelor, **diseminarea rezultatelor** prin actualizarea **paginii web** a proiectului, participarea cu lucrari la **Conferinte Nationale (1** prezentare orală**), publicarea unui articol într-o revistă cotată ISI, si a două capitole de carte** la Editurile ELSEVIER si SPRINGER. In plus au fost afisate **3 servicii de cercetare pe platforma EERIS.**

Diseminarea si valorificarea rezultatelor cercetării (IBPC, UPB, ICMPP)

Indicatori de realizare: *Actualizare pagina web a proiectului*

● A fost actualizata pagina web a proiectului care poate fi gasita la adresa: http://www.icbp.ro/static/en/en-networking_grants-grants-national_grants/intera.html

● A fost **publicata lucrarea** „Evaluation of VCAM-1 Targeted Naringenin/Indocyanine Green-Loaded Lipid Nanoemulsions as Theranostic Nanoplatforms in Inflammation" (2020) Fuior E.V.; Mocanu C.A.; Deleanu M.; Voicu G.; Anghelache M.; Rebleanu D.; Simionescu M.; Calin M. Pharmaceutics 2020, 12, 1066. doi: 10.3390/pharmaceutics12111066, factor de impact 4.421,

iar lucrarea „Synthesis and Applications of Magnetite –Silica Core/ Shell Nanostructures. A Review"; Spoială Angela, Ilie Cornelia -Ioana, Ficai Denisa, Ficai Anton, Andronescu Ecaterina este in revizia a 2-a.

● **Capitole în monografii**

1) Fuior EV, Calin M (2020), Nanoparticle-based delivery of polyphenols for the treatment of inflammation-associated diseases. In Book: Advances and Avenues in development of novel carriers for Bioactives and biological agents, Editors: Manju Rawat Singh, Deependra Singh, Jagat Kanwar, Nagendra Singh Chauhan, 343-382, Academic Press, ELSEVIER, ISBN: 978-0-12-819666-3. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819666-3.00012-2.

2) Fifere A., Turin Moleavin I.-A., Lungoci A.-L., Marangoci N. L., Pinteala M. (2020), Inorganic nanoparticles as free radical scavengers in New Trends in Macromolecular and Supramolecular Chemistry for Biological Applications; (Eds.) M. Abadie, M. Pinteala, and A. Rotaru; Springer, ISBN 978-3-030-57456-7.

● Au fost afișate 3 servicii de cercetare pe platforma EERIS:

- IBPC-NS: „Synthesis and characterization of polyphenol-loaded nanoparticles" https://eeris.eu/ERIF-2000-000R-0336 ;
- UPB: „Advanced synthesis and manufacturing" https://eeris.eu/ERIF-2000-000H-0593 ;
- ICMPP: „Magnetic nanoparticles for biomedical applications" https://eeris.eu/ERIF-2000-000Z-0217.

● Participari la manifestari stiintifice nationale:

1) Cornelia-Ioana ILIE, Anton FICAI, Angela SPOIALĂ, Lia-Mara DIȚU, Doina-Roxana TRUȘcĂ, Adrian-Vasile SURDU, Adrian-Ionuț NICOARĂ, Ovidiu-Cristian OPREA, Denisa FICAI, Manuela CĂLIN, Ecaterina ANDRONESCU; Sisteme magnetice inteligente cu eliberare controlată pentru aplicații medicale, Aplicații ale Chimiei in Nanoștiințe si Ingineria Biomaterialelor- Academia Oamenilor de Știință din România, 16-17 iulie 2020, conferinta online, prezentare orala.

PROIECT INTERA 4

CO: Institutul de Biologie si Patologie Celulara „ N. Simionescu”, Bucuresti
P1: Institutul De Chimie Macromoleculara “Petru Poni”, Iasi

Etapa 2020 – Complexarea conjugatelor "CORE-PEI" si a "CORE-PEI-R" cu plasmide de interes; testare in vitro

În cadrul etapei 3, proiect component INTERA 4 a fost sintetizat un lot stoc de NPM-PEI, au fost complexate conjugatele „CORE-PEI” și „CORE-PEI-R” cu plasmide de interes iar poliplecșii obținuți au fost caracterizați și testați in vitro, pe culturi celulare, pentru evaluarea citotoxicității și a randamentului de transfecție.

Obiectivul etapei 3 a proiectului P4-INTERA a fost indeplinit in totalitate. Au fost îndepliniți toți indicatorii de realizare propusi, si anume: **1 raport de sinteză** a nanoparticulelor NPM-PEI; **1 raport de obținere poliplexe, 1 raport privind citotoxicitatea și eficienta transfectie a poliplexelor, diseminarea rezultatelor** prin **publicarea a doua articole** în reviste cotate ISI și participarea cu lucrări la **Conferinte Nationale (2**) și **Internationale (1).**

–Diseminarea și valorificarea rezultatelor cercetării

● Lucrări publicate în reviste indexate ISI:

1) *Nano-Polyplexes Mediated Transfection of Runx2-shRNA Mitigates the Osteodifferentiation of Human Valvular Interstitial Cells*”, Geanina Voicu, Daniela Rebleanu, Cristina Ana Constantinescu, Elena Valeria Fuior, Letitia Ciortan, Ionel Droc, Cristina Mariana Uritu, Mariana Pinteala, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Pharmaceutics 2020, **PMID 32498305**.
2) *Effect of TAT-DOX-PEG irradiated gold nanoparticles conjugates on human osteosarcoma cells*, R.V. Lupusoru, D.A. Pricop, C. M. Uritu, A. Arvinte, A. Coroaba, I. Esanu, M. F. Zaltariov, M. Silion, C.Stefanescu, M. Pinteala, Scientific Reports, (2020) 10:6591, https://doi.org/10.1038/s41598-020-63245-8

● Conferinte:

1) Iron oxide nanoparticles conjugated with cerium oxide nanoparticles as free radical scavengers with magnetic properties; PREZENTARE – A.Fifere, A.-L. Lungoci, I. A. Turin Moleavin, N. L. Marangoci, Anca Roxana Petrovici, Mariana Pinteală, 5 th International Conference on Chemical Engineering Romania, ICCE 2020, Iași, 28 – 30 octombrie 2020, Celebrating 100 years since the birth of Prof. Cristofor I. Simionescu.
2) Cannabidiol-rich hemp oil induces apoptosis in cancer cell lines, N. Simionescu, A. I. Sandu, V. Paraschiv, M. Silion, A. R. Petrovici, M. Pinteală, 5 th International Conference on Chemical Engineering Romania, ICCE 2020, Iași, 28 – 30 octombrie 2020, Celebrating 100 years since the birth of Prof. Cristofor I. Simionescu.
3) Inclusion complexes of new ibuprofen thiazolidin-4-ones with β-cyclodextrin, I. Vasincu, A. R. Petrovici, M. Apotrosoaei, F. Lupașcu, M. Pinteală, N. Marangoci, L. Profire; The 1st International Electronic Conference on Pharmaceutics, 01-15 decembrie 2020;

Un serviciu nou a fost afisat in platforma ERRIS (design plasmide si strategii clonare moleculara) - https://eeris.eu/ ERIF-2000-000Z-0332, mentionandu-se procurarea softului necesar efectuarii acestui serviciu din proiectul INTERA.

ACADEMIA ROMÂNĂ
Şcoala de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR)

FIŞA SUCCINTĂ A DISCIPLINEI: INTERSECTIA STIINTELOR IN CERCETAREA BIOMEDICALA A SECOLULUI XXI

1. Date despre program

1.1 Departamentul	Ştiinţele vieţii, medicale şi agricole
1.2 Instituţia	Academia Română
1.3 Domeniul de studii	Biologie
1.4 Ciclul de studii	Doctorat

2. Date despre disciplină

2.1 Denumirea disciplinei	Intersecţia ştiinţelor in cercetarea biomedicala a secolului XXI						
2.2 Titularul activităţilor de curs	Acad Maya Simionescu						
2.3 Titularul activităţilor de seminar	Acad Maya Simionescu						
2.4 Titularul activităţilor de laborator							
2.5 Anul de studiu	I	**2.6 Semestrul**	I	**2.7 Tipul de evaluare**	E*	**2.8 Regimul disciplinei**	DF**

3. Timpul total estimat (ore pe semestru al activităţilor didactice)

3.1 Număr de ore pe săptămână	4	**Din care:**			
3.2 curs	2	**3.3 seminar**	2	**3.4 laborator**	0
3.5 Total ore din planul de învăţământ	56	**Din care:**			
3.6 curs	28	**3.7 seminar**	28	**3.8 laborator**	0

Distribuţia fondului de timp:	**ore**
Studiul după manual, suport de curs, bibliografie şi notiţe	60
Documentare suplimentară în bibliotecă, pe platformele electronice de specialitate şi pe teren	100
Pregătire seminarii/laboratoare, teme, referate, portofolii şi eseuri	100
Tutorat	55
Examinări	4
Alte activităţi:	–

3.9 Total ore studiu individual	319
3.10 Total ore pe semestru	375
3.11 Numărul de credite	15

4. „Rezultatele învăţării" şi competenţele specifice acumulate

1. Cunoaşterea şi însuşirea principiilor de organizare a celulei in corelaţie cu alte discipline: biologia, chimia, biochimia, biofizica, genetica, matematica si bioinformatica.
2. Capacitatea de a utiliza cunoştinţele dobândite prin integrarea unitara a principiilor de structura si funcţionarea coerentă a sistemelor vii.
3.Utilizarea cunoştinţelor pentru modelarea experimentala care sa conducă la înţelegerea mecanismelor de semnalizare intracelulara si intercelulara cu potenţial aplicativ in clinica si medicina personalizata.
4. Abilitatea de a utiliza metode de studiu aprofundat al metodologiei cercetării si/sau prelucrării statistice a datelor care sa conducă la rezultate concrete cu semnificaţie biomedicala.
5. Cunoştinţele şi abilităţile acumulate în cadrul acestei discipline vor sta la baza activităţilor de cercetare ştiinţifică şi didactice viitoare.

5. Evaluare

Tip activitate	**5.1 Criterii de evaluare**	**5.2 Metode de evaluare**	**5.3 Pondere din nota finală**
5.4 Curs	Cunoştinţe dobândite	Examen scris si oral	65%
5.5 Seminar	Activitate	Rapoarte de cercetare	35%
5.6 Laborator			
5.7 Standard minim de performanţă: Cunoaşterea a 70% din informaţia conţinută în curs			

Semnătură titular curs — Acad Maya Simionescu

Semnătură titular seminar — Acad Maya Simionescu

Semnătură titular laborator

*E = Examen. C = Colocviu.
**DF = Disciplină Fundamentală. DS = Disciplină de Specialitate.

EVOCARE: PROF. NICOLAE SIMIONESCU

ARHITECTUL ȘCOLII ROMÂNEȘTI DE BIOLOGIE CELULARĂ

27 Iunie 1926 – 6 Februarie 1995

Către echipa IBPC: Să ne întâlnim Joi, 6 februarie 2025, ora 12.30 în Aula "George Palade" să evocăm împreună personalitatea Profesorului Nicolae Simionescu, Co-fondatorul Casei noastre Științifice.

12.30 - 14.00 Alocuţiuni:

MAYA SIMIONESCU
ILEANA MÂNDUŢEANU
JINGA VICTOR
DOINA POPOV
FELICIA ANTOHE
ADRIAN MANEA
MIREL POPA

14.00 – Întâlnirea paricipanților în sala H

Academia Română
Institutul de Biologie și Patologie Celulară
"Nicolae Simionescu"

SIMPOZION ANIVERSAR

bucureşti 19-20 septembrie 2019

Academia Română
Institutul de Biologie și PatologieCelulară
"Nicolae Simionescu"

Vă invităm să onoraţi cu prezenţa Dumneavoastră o sărbătoare a Ştiinţei Româneşti

Simpozionul Aniversar

"O călătorie fascinantă de 40 de ani pentru descoperirea secretelor celulei în beneficiul sănătății omului"

"An incredible 40-year journey to uncover cell's secrets for the benefit of human health"

organizat cu prilejul împlinirii a
40 de ani de activitate
a Institutului nostru.

Bucuresti, 19 - 20 Septembrie, 2019

Deschiderea va avea loc
JOI 19 SEPTEMBRIE 2019, ora 9.30
Aula Academiei Romane

Ne-am bucura daca veţi fi alaturi de noi la acest moment aniversar.

Acad. Maya Simionescu
Director

PROGRAM

JOI, 19 SEPTEMBRIE 2019 - Aula Academiei Române

9.30 - 10.15 Deschiderea Simpozionului

Acad. Ioan -Aurel Pop – Președintele Academiei Române
Acad. Maya Simionescu–Director al IBPC "N. Simionescu"

10.15 -11.30 Evocări

CHAIRS: Maya Simionescu, Sam Silverstein

Prof Sam Silverstein – Columbia University Medical Center, USA: "Maya and Nicolae Simionescu, George Palade, and the founding of ICBP"
Prof. Irinel Popescu – Președintele Academiei de Ştiinţe Medicale
Prof. Radu Deac – Vicepreședintele Academiei de Ştiinţe Medicale
Prof. Jean Askenasy – Tel-Aviv University, Israel, Membru de onoare al Academiei Române,
Prof. Werner Franke – German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany: "Those were the years of key importance in the history of science: 1979 – Molecules meet Methods"
Acad. Doina Popov – IBPC "N. Simionescu"
Dr. Anca Dobrian – Eastern Virginia Medical School, USA: "Tell them of battles, kings, elephants and, endothelial cells"

Prof. Angello Azzi – Tufts University, USA: "UNESCO-MCBN-ICPB: Acronyms for a better science"
Dr. Florea Lupu – Universitatea din Oklahoma, USA

11.30-12:00: FOTOGRAFIE DE GRUP – PAUZĂ DE CAFEA

12:00 -13:45 Descoperiri, noutăți în laboratoarele IBPC-NS

CHAIRS: Doina Popov, Jean Askenasy

12.00-12.15 Anca Sima: "Lipidomics, a pioneering domain in ICBP"
12.15-12.30 Ileana Mânduţeanu: "Vascular and valvular inflammation in atherosclerosis and diabetes: new mechanisms and targets for nanobiotherapies"
12.30-12.45 Felicia Antohe: "Toward precision medicine on the road from cell receptors to cell proteomics"
12.45-13.00 Adriana Georgescu: "Vascular endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, new biomarkers and therapies"
13.00-13:15 Anca Gafencu: "Apolipoproteins: gene regulation and manipulation for therapeutic purposes"
13.15-13.30 Adrian Manea: "Epigenetic mechanisms in atherosclerosis: biomarkers and therapeutic targets"
13.30-13.45 Alexandrina Burlacu: Advances in MSC-based therapies for tissue regeneration"

13:45-15:00: PAUZĂ DE PRÂNZ /
Sesiune de postere: **Proiectul Theravaldis**

15.00- 19.00: Workshop THERAVALDIS: "Cardiac valves disease: new targets for therapies and tissue engineering"

CHAIRS: Werner Franke, Ileana Manduteanu, Agneta Simionescu

15:00-15:25 Ileana Mânduţeanu: Overview of the project. "Early diabetes associated alterations of aortic heart valves in a murine model of atherosclerosis"
15:25-15:50 Alexandru Fillipi: "Early diabetes induces alterations in endothelial progenitor cell phenotype and homing in a murine model of atherosclerosis"
15:50-16.15 Elena Butoi: "3D aortic valve leaflet: a model to study the effect of diabetes in valve calcification"
16.15-16.40 Manuela Călin: "The innovative nanotherapeutics designed for targeted delivery of shRNA to diseased aortic valve"
16.40-17.05 Agneta Simionescu:
"Tissue Engineered Mitral Valve"
17.05-17.30 Werner Franke: "The special molecular organization of major structures in valvular cells"
17.30-17.55 Radu Deac: "The pericardium - biological tissue for artificial heart valves "
17.55-18.20 Dan Simionescu: "The VALVE-REGEN project; extracellular matrix scaffolds, adult stem cells and bioreactors for cardiac valve tissue regeneration"
18.20-18.45 Ionel Droc: "Transcatether aortic valve replacement (TAVI) - our experience in Military Hospital"
18.45 -19.00 Discussion and perspectives

19:30: WELCOME DINNER

VINERI, 20 SEPTEMBRIE 2019 - Aula George Emil Palade, IBPC "N. Simionescu "

9.00-11.00 Sesiune Ştiinţifică I: "Cells and genes"

CHAIRS: Dimitris Kardassis, Anca Sima

9.00 - 9.25 Jean Askenasy: "Endothelial Cell Function In The Blood-Brain-Barrier"
9.25 - 9.50 Anca Dobrian: "Endothelial cell plasticity in adipose tissue"
9.50 -10.15 Angelo Azzi: "Aging and Dietary Biofactors"
10.15 -10.40 Dimitris Kardassis: "Identification of new genes and miRNAs that are implicated in the pathogenesis of the Metabolic Syndrome in mice: a transcriptomics approach"
10.40 -11.05 Mircea Ivan: "Cellular Oxygen Sensing: From HIF-Prolyl Hydroxylases to Noncoding RNAs"

11:05 -11:30 PAUZĂ DE CAFEA

11.30 -14.00 Sesiune Ştiinţifică II: "Cell Function and Dysfunction"

CHAIRS: Angelo Azzi, Florin Lupu

11.30 -11.55 Sam Silverstein: "A critical concentration of effector leukocytes is required to eradicate bacteria and cancer cells"
11.55 -12.20 Florin Lupu: "Targeting host responses as sepsis therapy"
12.20 -12.45 Cristina Lupu: "Role of Androgen-Dependent

Tissue Factor Pathway Inhibitor Regulating Protein (ADTRP) in Vascular Development and Function"
12.45 -13.10 Alexandru Schiopu: "Inflammation and repair in myocardial infarction"
13.10 -13.35 Zorina Galis: "The Human BioMolecular Atlas Program" (HuBMAP): Mapping the human body, one cell at a time"
13.35 -14.00 Șerban Moroșan: "Transparency and Communication on animal used for scientific research: Challenges and Opportunities"

14.00 -15.30 PAUZĂ DE PRÂNZ /Sesiune de postere

15.30 -19.00 Workshop DIABETER: "Searching for a novel therapy for type 1 diabetes"

CHAIRS: Maya Simionescu, Nadir Askenazy

15.30 -16.30 Session I: Therapeutic approaches to diabetes

15.30 -16.00 Irit Meivar Levy: "Liver to pancreas transdifferentiation; potential cell replacement therapy for Diabetes"
16.00 -16.15 Andrei Văcaru: "Reinstating self-tolerance in prediabetic mice by bone marrow transplantation"
16.15 -16.30 Alexandrina Burlacu: DIABETER Project presentation "Mesenchymal stromal cells as vectors with therapeutic potential to abrogate diabetic autoimmunity"

16.30 -17.00 PAUZĂ DE CAFEA

17.00 -18.10 Session II: Molecular design of death-inducing mesenchymal stromal cells

17.00 -17.10 Ana Văcaru: "Mesenchymal stromal cells as vectors for expression of death molecules"
17.10 -17.25 Mihai Bogdan Preda: "Remote activity of mesenchymal stromal cells in chemical diabetes"
17.25 -17.40 Anca Gafencu: "Three killer molecules: engineering adenoviruses for expression of FasL, TNFα and TRAIL"
17.40 -17.50 Mădălina Dumitrescu: "Granting killer properties to mesenchymal stromal cells by FasL- adenoviral transduction"
17.50 -18.00 Violeta Trusca: "The killing capacity of mesenchymal stromal cells -overexpressing TNFα"
18.00 -18.10 Marton Fogarasi: "Design and engineering of TRAIL-expressing mesenchymal stromal cells"

18.10 -19.00 Session III: Lessons from in vivo studies of killer MSC

18.10 -18.25 Mădălina Fenyo: "Immunomodulation of diabetic mice with killer cells"
18.25 -18.35 Ana-Maria Catrina: "Diabetic status determined by islet inflammation and insulin production in immunomodulated diabetic mice"

18.35 -19.00 Discussion

19:30: GALA DINNER

MECANISME DE RECUNOAȘTERE A CALITĂȚII DE CONDUCĂTOR DE DOCTORAT ȘI DE ECHIVALARE A DOCTORATULUI OBȚINUT ÎN ALTE STATE ȘI DE RECUNOAȘTERE A STUDIILOR UNIVERSITARE

Recunoaşterea și echivalarea studiilor universitare

CNRED recunoaște actele de studii de nivel universitar (licenţă, master şi doctorat) prin evaluarea și stabilirea nivelului, domeniului și/sau a specializării actului de studii obținut în străinătate raportat la sistemul românesc de învățământ.

În urma evaluării, CNRED poate recunoaște automat actele de studii obținute la universități din UE și universități de prestigiu din alte state sau cu aplicarea de examene de diferenţă sau alte măsuri compensatorii, nivelul diplomei, domeniul de studii și/sau specializarea. În procedura de recunoaștere în vederea continuării studiilor, CNRED colaborează cu instituțiile de învățământ superior din România. Documentul emis de CNRED, în urma evaluării, este Atestatul de echivalare/recunoaștere a studiilor, document care permite continuarea studiilor sau accesul pe piața forței de muncă din România.

Pentru persoanele care au obținut calitatea de conducător de doctorat în străinătate și doresc afilierea la Școala de Studii Avansate a Academiei Române – SCOSAAR, este necesară recunoașterea calității de conducător de doctorat conform legislației în vigoare, respectiv de către CNRED. De asemenea persoanele care doresc să se înscrie la admiterea la doctorat la Școala de Studii Avansate a Academiei Române – SCOSAAR este necesar să prezinte la înscriere diplomele recunoscute de către CNRED.

Cetăţeni din state membre ale Uniunii Europene, Spaţiului Economic European şi din Confederaţia Elveţiană / membru de familie / protecţie subsidiară

Cetațenii care doresc sa urmeze studii universitare de master/ doctorat/DPPD în România pot solicita direct Centrului Național de Recunoaștere și Echivalare a Diplomelor recunoașterea diplomei în vederea obținerii atestatului/ adeverinței de recunoaștere a studiilor. Mai multe informații puteți găsi la: http://cnred.edu.ro/#recunoastere-studii-cetateni-europeni-admitere-master-doctorat-DPPD

Sursa: https://www.edu.ro/Studen%C8%9Bi%20cet%C4%83%C8%9Beni%20str%C4%83ini

Recunoaşterea și echivalarea

Procedurile de recunoaştere şi echivalare pentru diplomele de nivel licenţă, master şi doctorat se aplică diplomelor obţinute la universităţi din state terţe, cu excepţia universităţilor de prestigiu din aceste state pentru care se aplică procedura recunoașterii automate.

CNRED recunoaște actele de studii de nivel universitar prin evaluarea și stabilirea nivelului, domeniului și/sau a specializării actului de studii obținut în străinătate raportat la sistemul românesc de învățământ.

În urma evaluării, CNRED poate recunoaște nivelul diplomei, domeniul de studii și/sau specializarea, automat sau prin susținerea de examene de diferenţă sau alte măsuri compensatorii.

Această procedură se aplică atât pentru continuarea studiilor în România, cât și pentru accesul la piața forței de muncă.

CNRED recunoaște, în baza unui dosar, în termen de 30 zile, diplomele de licență și master. În anumite cazuri, diplomele de licență și master sunt evaluate de către Consiliul Național de Evaluare a Diplomelor (CNED), în vederea recunoașterii sau echivalării.

CNRED recunoaște, în baza unui dosar, în termen de 30 zile, diplomele de doctor. Acest termen se poate prelungi în mod corespunzător în cazul efectuării unor verificări suplimentare sau în cazul în care CNRED înaintează dosarul spre evaluare Consiliului Național de Atestare a Titlurilor, Diplomelor și Certificatelor Universitare (C.N.A.T.D.C.U.).

Recunoaşterea automată

Prin aplicarea procedurii automate, CNRED recunoaște, fără a dispune susținerea de examene de diferenţă sau alte măsuri compensatorii, nivelul diplomei şi domeniul de studii. În cazul în care specializarea obținută în străinătate are corespondent în România, CNRED recunoaște, la cerere, această specializare.

Recunoașterea automată se aplică atât pentru continuarea studiilor în România, cât și pentru accesul la piața forței de muncă. Pentru continuarea studiilor în învățământul universitar din România, CNRED colaborează cu instituțiile de învățământ superior.

CNRED recunoaște, în baza unui dosar, actele de studii obținute la universități din UE și universități de prestigiu din alte state.

Termenul de recunoaștere pentru diplomele de licență, master și doctor este de 30 zile.

CNRED aplică procedura de recunoaştere automată din anul 2008 pentru diplomele obţinute la instituţii de învăţământ acreditate din orice stat al Uniunii Europene, SEE şi Confederaţia Elveţiană.

Procedura de recunoastere automată nu se aplică și diplomelor care dau acces la exercitarea unei profesii reglementate, caz în care se verifică respectarea prevederilor minime obligatorii stabilite prin legislația europeană și națională.

Sursa: https://cnred.edu.ro/ro/studii-universitare

La Școala de Studii Avansate a Academiei Române sunt acceptați persoanele abilitate în străinătate și persoanele ce vor să urmeze studiile universitare de doctorat care dețin diplome universitare recunoscute de CNRED

Sursa:

https://cnred.edu.ro/ro/studii-universitare

https://www.edu.ro/recunoastere-echivalare-diplome

https://www.edu.ro/Studen%C8%9Bi%20cet%C4%83%C8%9Beni%20str%C4%83ini

NANODIATER MEETINGS:

1) 9-11 July 2011, Bucharest, Romania (Kick-off meeting)

2) 17-18 February 2012, Bucharest, Romania

3) 24-25 August 2012, Bucharest, Romania

4) 19-20 April 2013, Bucharest, Romania

5) 21-25 October 2013, Istanbul, Turcia

Anexa 20

MEMORIUL ȘTIINȚIFIC

Subsemnata **Anghelache Maria Florentina**, student doctorand în cadrul SCOSAAR, Școala Doctorală de Științele Vieții, înmatriculat la data **de 2.11.2020** în domeniul de studii universitare de doctorat **Biologie**, la conducătorul de doctorat **Acad. Ileana Mânduțeanu**, autor al tezei de doctorat cu titlul „**Strategii nanoterapeutice inovatoare pentru țintirea inflamației vasculare în ateroscleroză**”, declar următoarele activități realizate in cadrul stagiului doctoral (se vor păstra doar activitățile realizate):

A. Lista de lucrări științifice

1. **Anghelache, M.**, Voicu, G., Anton, R., Safciuc, F., Boteanu, D., Deleanu, M., Turtoi, M., Simionescu, M., Manduteanu, I., Calin, M. *Inflammation resolution-based treatment of atherosclerosis using biomimetic nanocarriers loaded with specialized pro-resolving lipid mediators*. Materials Today Bio 32, 2025.
2. **Anghelache, M.**, Voicu, G., Deleanu, M., Turtoi, M., Safciuc, F., Anton, R., Boteanu, D., Fenyo, I.M., Manduteanu, I., Simionescu, M., Calin, M. *Biomimetic Nanocarriers of Pro-Resolving Lipid Mediators for Resolution of Inflammation in Atherosclerosis*. Adv Healthcare Materials 13, 2024.
3. Movileanu, C.#, **Anghelache, M.**#, Turtoi, M., Voicu, G., Neacsu, I.A., Ficai, D., Trusca, R., Oprea, O., Ficai, A., Andronescu, E., Calin, M. *Folic acid-decorated PEGylated magnetite nanoparticles as efficient drug carriers to tumor cells overexpressing folic acid receptor*. International Journal of Pharmaceutics 625, 2022.
4. Turtoi, M.#, **Anghelache, M.**#, Bucatariu, S.-M., Deleanu, M., Voicu, G., Safciuc, F., Manduteanu, I., Fundueanu, G., Simionescu, M., Calin, M. *A novel platform for drug testing: Biomimetic three-dimensional hyaluronic acid-based scaffold seeded with human hepatocarcinoma cells*. International Journal of Biological Macromolecules 185, 2021.
5. **Anghelache, M.**, Turtoi, M., Petrovici, A.R., Fifere, A., Pinteala, M., Calin, M. *Development of Dextran-Coated Magnetic Nanoparticles Loaded with Protocatechuic Acid for Vascular Inflammation Therapy*. Pharmaceutics 13, 1414, 2021.
6. Motelica, L., Voicu, G., Chircov, C., Surdu, A.V., Trusca, R.D., Vasile, B.S., Ficai, D., Oprea, O.C., Marta, D.S., Peteu, V.-E., **Anghelache, M.**, Ficai, A., Calin, M. *Aspartic acid functionalized magnetic nanoparticles for enhanced internalization in tumoral cell*. J Aust Ceram Soc 61, 2025.
7. Voicu, G., Mocanu, C.A., Safciuc, F., Rebleanu, D., **Anghelache, M.**, Cecoltan, S., Droc, I., Simionescu, M., Manduteanu, I., Calin, M. *VCAM-1 targeted nanocarriers of shRNA-Smad3 mitigate endothelial-to-mesenchymal transition triggered by high glucose*

concentrations and osteogenic factors in valvular endothelial cells. International Journal of Biological Macromolecules 281, 2024.

8. Voicu, G., Mocanu, C.A., Safciuc, F., **Anghelache, M.**, Deleanu, M., Cecoltan, S., Pinteala, M., Uritu, C.M., Droc, I., Simionescu, M., Manduteanu, I., Calin, M. *Nanocarriers of shRNA-Runx2 directed to collagen IV as a nanotherapeutic system to target calcific aortic valve disease*. Materials Today Bio 20, 2023.
9. Turtoi, M., **Anghelache, M.**, Patrascu, A.A., Deleanu, M., Voicu, G., Raduca, M., Safciuc, F., Manduteanu, I., Calin, M., Popescu, D.-L. *Antitumor Properties of a New Macrocyclic Tetranuclear Oxidovanadium(V) Complex with 3-Methoxysalicylidenvaline Ligand*. Biomedicines 10, 2022.
10. Fundueanu, G., Constantin, M., Turtoi, M., Bucatariu, S.-M., Cosman, B., **Anghelache, M.**, Voicu, G., Calin, M. *Bio-Responsive Carriers for Controlled Delivery of Doxorubicin to Cancer Cells*. Pharmaceutics 14, 2022.
11. Popescu, I., Turtoi, M., Suflet, D.M., Dinu, M.V., Darie-Nita, R.N., **Anghelache, M.**, Calin, M., Constantin, M. *Alginate/poloxamer hydrogel obtained by thiol-acrylate photopolymerization for the alleviation of the inflammatory response of human keratinocytes*. International Journal of Biological Macromolecules 180, 2021.
12. Turtoi, M., **Anghelache, M.**, Patrascu, A.A., Maxim, C., Manduteanu, I., Calin, M., Popescu, D.-L. *Synthesis, Characterization, and In Vitro Insulin-Mimetic Activity Evaluation of Valine Schiff Base Coordination Compounds of Oxidovanadium(V)*. Biomedicines 9, 2021.

- autori cu contribuție egală

B. Participări la conferințe/workshop-uri

1. **Anghelache, M.**, *Macrophage Membranes-Functionalized Lipid Nanoemulsions as Promising Carriers of Pro-Resolving Lipid Mediators to Atherosclerotic Lesions*, 40th Annual Scientific Session of The Romanian Society for Cell Biology, Oral presentation, 16-17 November 2023, Online– oral presentation
2. **Anghelache, M.**, *Pro-resolving Lipid Mediators-loaded Biomimetic Nanoparticles as Promising Carriers for Inflammation Resolution in Atherosclerosis*, The 47th FEBS Congress, Oral presentation, Tours, France, 8-12 July 2023 – oral presentation
3. **Anghelache, M.**, *Preparation and characterization of macrophage-membrane coated nanoemulsions for delivery of specialized pro-resolving lipid mediators of inflammation*, 38th Annual Scientific Session of The Romanian Society for Cell Biology, 4 November 2021, Online– oral presentation

4. **Anghelache, M.**, Deleanu, M., Anton, R., Turtoi, M., Voicu, G., Manduteanu, I., Simionescu, M., Calin, M., *Specialized pro-resolving mediators (SPMs)-loaded Nanoemulsions as promising biomimetic nanocarriers for inflammation resolution*, The 47th FEBS Congress, Tours, France, 8-12 July 2023 – poster
5. **Anghelache, M.**, Deleanu, M., Anton, R., Turtoi, M., Voicu, G., Manduteanu, I., Simionescu, M., Calin, M., *Development of Biomimetic Nanocarriers for Delivery of Pro-Resolving Mediators to Atherosclerotic Plaque*, "The 39th Annual Scientific Session of The Romanian Society for Cell Biology", 21-23 October 2022 – poster
6. **Anghelache, M.**, Deleanu, M., Turtoi, M., Voicu, G., Calin, M., *Development of Biomimetic Nanocarriers for delivery of Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators (SPMs) to atherosclerotic plaque*, "Materials, Methods & Technologies", Burgas, Bulgaria, 19-22 August 2022 – poster
7. **Anghelache, M.**, Deleanu, M., Turtoi, M., Voicu, G., Calin, M., *Preparation and physico-chemical characterization of specialized pro-resolving lipid mediators (SPMs)-loaded nanoemulsions as nanocarriers for inflammation resolution*, "International Conferences & Exhibition on Nanotechnologies, Organic Electronics & Nanomedicine", Thessaloniki, 06-09 July 2021 – poster
8. **Anghelache, M.**, Safciuc, F., Voicu, G., Turtoi, M., Ilie, C.I., Ficai, A., Calin, M., *Chitosan-coated iron oxide nanoparticles as a promising nanocarriers for gallic acid targeted delivery*, "International Conferences & Exhibition on Nanotechnologies, Organic Electronics & Nanomedicine", Thessaloniki, 06-09 July 2021 – poster

C. Brevete

1. Aplicație de patent nr. A/00388, cu data de depozit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci (OSIM) 20.07.2023 și titlul „*Nanosisteme magnetice inteligente pentru vectorizarea celulară a compușilor bioactivi*", autori: Movileanu C., Ficai D., Ficai A., Călin M., **Anghelache M.**, Gafencu A., Fundueanu-Constantin G., Pinteală M., Simionescu M., Andronescu E.

D. Proiecte

1. **ERANET-NANOTECMEC (2025-2027)** – „Nanovehicule pentru transportul Ago/antagomiR utilizate pentru imunoreglare: o posibilă abordare în tratamentul cancerului și transplantului pulmonar (SAIL)", director de proiect Dr. Rostyslav Billy.
2. **PNRR-III-C9-2022-I8-CF93 (2023-2026)** – „Noi strategii nanoterapeutice care țintesc mecanismele implicate în tranziția fibroblast-miofibroblast pentru tratamentul fibrozei cardiace (HeartCure)", director de proiect Dr. Rostyslav Billy, responsabil științific instituția gazdă Dr. Manuela Călin

3. **H2020-EU.1.2.-AMD-861878-17 (2020-2025)** – „Dezvoltarea unor amplificatori „inteligenți" ai speciilor reactive de oxigen, specifici pentru neutrofilele polimorfonucleare aberante, pentru tratamentul bolilor inflamatoare și autoimune, al cancerului și al mieloablației. (NeutroCure)", director de proiect Prof. Dr. Andriy Mokhir.
4. **PN-II-P4-ID-PCE-2020-2465 (2021-2023)** – „Terapie direcționată bazată pe nanocarrieri biomimetici pentru rezoluția inflamației în ateroscleroză (NANORES)", director de proiect Dr. Manuela Călin.
5. **PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697 (2018-2021)** – „Terapii inteligente pentru boli non-comunicabile, bazate pe eliberarea controlată de compuși farmacologici din celule încapsulate după manipulare genetică sau bionanoparticule vectorizate (INTERA)", director proiect: Acad. Maya Simionescu, coordonator proiect component 3 "Nanobioparticule inteligente concepute pentru vectorizarea compușilor bioactivi pentru terapia inflamației vasculare": Dr. Manuela Călin.

E. Stagii de cercetare/perfecționare

1. **Stagiu de cercetare CARDIOSCOPE** – „Comprehensive and personalized assessment of acute coronary syndrome by multiomic approach and artificial intelligence strategy", HORIZON-MSCA-2021-SE-01, Multimedica, Milano, 12 martie – 11 aprilie 2025.

F. Cursuri de perfecționare

1. Al 9-lea Curs Internațional privind Animalele de Laborator (**FELASA**), Creta, Heraklion, mai–iunie 2023.
2. Cursul „**Flow Cytometry Training School**". Asociația Română de Citometrie, București, 14–15 decembrie 2020.

G. Alte activități

1. Medalie de Aur – Invenții, soiuri de plante, design industrial: „Smart nanoparticle systems for cellular internalization", Autori: Movileanu C., Ficai D., Ficai A., Calin M., **Anghelache M.**, Gafencu A., Fundueanu-Constantin G., Pinteala M., Simionescu M., Andronescu E.; Expoziția Internațională Specializată "INFOINVENT 2021" – Ediția a XVII-a, 17-20 noiembrie 2021, Chișinău, Republica Moldova.
2. Medalie de Aur – „Smart nanoparticle systems for cellular internalization", Autori: Movileanu C., Ficai D., Ficai A., Calin M., **Anghelache M.**, Gafencu A., Fundueanu-Constantin G., Pinteala M., Simionescu M., Andronescu E.; Expoziția Internațională de Cercetare Științifică, Inovare și Invenții "PRO INVENT" – Ediția a XIX-a, 20-22 octombrie 2021, Cluj-Napoca, România.

3. Medalie de Aur – „Smart nanoparticle systems for cellular internalization”, Autori: Movileanu C., Ficai D, Ficai A., Calin M., **Anghelache M.**, Gafencu A., Fundueanu-Constantin G., Pinteala M., Simionescu M., Andronescu E.; Salonul Internațional de Invenții și Inovații "Traian Vuia", 12-14 octombrie 2021, Timișoara, România.
4. Bursă participare la congresul FEBS (2023)

Student-doctorand

……

Anexa 20

MEMORIUL ȘTIINȚIFIC

Subsemnata Comarița Ioana-Karla, student doctorand în cadrul SCOSAAR, Școala Doctorală de Științele Vieții, înmatriculată la data de 02.11.2020 în domeniul de studii universitare de doctorat Biologie, la conducătorul de doctorat C.S. I Dr. Adriana Georgescu, autor al tezei de doctorat cu titlul **Afectarea peretelui vascular în boala cardiovasculară aterosclerotică și boala cardiopulmonară: mecanismele moleculare implicate și efectele terapiei mediate de vezicule extracelulare și siRNA**, declar următoarele activități realizate in cadrul stagiului doctoral (se vor păstra doar activitățile realizate):

A. Lista de lucrări științifice

Prim-autor (3):

1. **Comarița I.K.,** Vîlcu A., Constantin A., Procopciuc A., Safciuc F., Alexandru N., Dragan E., Nemecz M., Filippi A., Chiţoiu L., Gherghiceanu M., Georgescu A. **Therapeutic Potential of Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles on Atherosclerosis-Induced Vascular Dysfunction and Its Key Molecular Players**. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022, *10*, doi:10.3389/fcell.2022.817180 - factor de impact - 6.684, Q1
2. **Comarița I. K.,** Tanko G., Anghelache I.L., Georgescu A. **The siRNA-mediated knockdown of AP-1 restores the function of the pulmonary artery and the right ventricle by reducing perivascular and interstitial fibrosis and key molecular players in cardiopulmonary disease.** J Transl Med.; 22(1):137, 2024. doi: 10.1186/s12967-024-04933-1- factor de impact- 8.440, Q1

3. În curs de publicare: Alexandra Vîlcu, Ioana Karla Comarița, Alina Constantin, Nicoleta Alexandru, Miruna Nemecz, Florentina Safciuc, Florina Maria Bojin,Virgil Păunescu, Adriana Georgescu. **Innovative therapy with stem cell-derived extracellular vesicles on cardiac hypertrophy in an animal model of atherosclerosis; elucidation of the molecular mechanisms involved in the repair process.** *Biomolecules*, 2025, impact factor 4,8.

Co-autor (3):

1. Nicoleta Alexandru, Anastasia Procopciuc, Alexandra Vîlcu, **Ioana Karla Comarița**, Elisabeta Bădilă, Adriana Georgescu. **Extracellular vesicles—incorporated microRNA signature as biomarker and diagnosis of prediabetes state and its complications.** *Rev Endocr Metab Disord* (2021), doi.org/10.1007/s11154-021-09664-y – factor de impact 9.30, Q1
2. Constantin A, **Comarița IK**, Alexandru N, Filippi A, Bojin F, Gherghiceanu M, Vîlcu A, Nemecz M, Niculescu LS, Păunescu V, Georgescu A. **Stem cell-derived extracellular vesicles reduce the expression of molecules involved in cardiac hypertrophy-In a model of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes.** *Front Pharmacol*, 2022, doi: 10.3389/fphar.2022.1003684 - factor de impact- 5.98, Q1
3. Nemecz, M., Stefan, D.S., **Comarița, I.K.** *et al.* **Microvesicle-associated and circulating microRNAs in diabetic dyslipidemia: miR-218, miR-132, miR-143, and miR-21, miR-122, miR-155 have biomarker potential**. *Cardiovasc Diabetol* **22**, 260 (2023). doi.org/10.1186/s12933-023-01988-0 - factor de impact 9.3, Q1

B. Participări la conferințe/workshop-uri

Prezentări orale (1):

Al 42-lea Simpozion Aniversar al Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu" și a 38-a Sesiune Științifică Anuală a Societății Române de Biologie Celulară cu participare internațională, 4-6 Noiembrie, București, 2021. **Therapeutic Potential Of Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles On Atherosclerotic-Induced Vascular Dysfunction**.

Postere (11):

1. **Ioana Karla Comarița**, Alina Constantin, Alexandra Vîlcu, Anastasia Procopciuc, Florentina Safciuc, Nicoleta Alexandru, Emanuel Dragan, Miruna Nemecz, Alexandru Filippi, Adriana Georgescu. **Inflammation-induced arterial dysfunction in atherosclerosis; the modulating**

action of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *'Frontiers in CardioVascular Biomedicine,'* 29th April – 1st May 2022, Budapest – Hungary.

2. Miruna Nemecz, Diana Simona Stefan, Alina Constantin, Anastasia Procopciuc, **Ioana Karla Comarița**, Gabriela Tanko, Adriana Georgescu. **MicroRNAs in circulating microvesicles and plasma as biomarkers that complement the clinical diagnosis of diabetic dyslipidemia and its complications**. *'Frontiers in CardioVascular Biomedicine'*, 29th April – 1st May 2022, Budapest – Hungary.
3. **Comarița, K.I** et al. **Vascular wall damage in atherosclerotic cardiovascular disease; Positive effect of extracellular vesicle-based nanotherapeutics on endothelial dysfunction and its key molecular players**. Poster 042/#1044 at the '90th European Atherosclerosis Society Hybrid Congress' (EAS 2022), May 22th -25th, 2022, Milano, Italy.
4. Miruna Nemecz, Diana Simona Stefan, Gabriela Tanko, Alina Constantin, **Ioana Karla Comarița**, Adriana Georgescu. **Microvesicle-related and circulating microRNAs as potential biomarkers of diabetic dyslipidemia,** The anniversary symposium of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" "43 years of sustaining an excellence-promoting environment for cardiovascular research in Romania", December 8th-9th, Bucharest, Romania
5. **Ioana Karla Comarița**, Alexandra Vîlcu, Alina Constantin, Florentina Safciuc, Nicoleta Alexandru, Miruna Nemecz, Alexandru Filippi, Adriana Georgescu**. Therapeutic potential of stem cell-derived extracellular vesicles on atherosclerosis-induced vascular dysfunction and its key molecular players,** The anniversary symposium of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" "43 years of sustaining an excellence-promoting environment for cardiovascular research in Romania", December 8th-9th, 2022, Bucharest, Romania
6. Alina Constantin, **Ioana Karla Comarița**, Nicoleta Alexandru, Alexandru Filippi, Alexandra Vîlcu, Miruna Nemecz, Adriana Georgescu. **Stem cell - derived extracellular vesicles reduce the expression of molecules involved in cardiac hypertrophy - in a model of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes,** The anniversary symposium of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" "43 years of sustaining an excellence-promoting environment for cardiovascular research in Romania", December 8th-9th , 2022, Bucharest, Romania

7. **Ioana Karla Comarița**, Gabriela Tanko, Laurențiu Anghelache, Alina Constantin, Miruna Nemecz, Nicoleta Alexandru-Moise, Adriana Georgescu. **Tracking The Effect Of siRNA AP-1 As A Potential Therapeutic Strategy In Reversing The Pulmonary Arterial And Right Ventricular Dysfunction Associated With Cardiac And Pulmonary Fibrosis In A Model Of Cardiopulmonary Disease.** The 44th Annual Scientific Symposium Of The Institute Of Cellular Biology And Pathology "Nicolae Simionescu" - ICBP-NS - Held Jointly With 40th Annual Scientific Session Of The Romanian Society For Cell Biology - RSCB , 16-17 November 2023, Bucharest, Romania.
8. **Ioana Karla Comarița**, Alina Constantin, Alexandra Vîlcu, Anastasia Procopciuc, Florentina Safciuc, Nicoleta Alexandru, Miruna Nemecz, Adriana Georgescu. **Arterial dysfunction in an animal model of atherosclerosis; the beneficial effect of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in reducing inflammation**. 1st Meeting of the AtheroNET COST Action CA21153, 22th-24th March 2023, Bucharest, Romania.
9. **I K Comarița**, I L Anghelache, G Tanko, A Georgescu, The effects of siRNA-mediated knockdown of AP-1 on pulmonary arterial and right ventricular dysfunction associated with cardiac and pulmonary fibrosis in cardiopulmonary disease, *'Frontiers in CardioVascular Biomedicine*, 12-14 april, 2024, Amsterdam, The Netherlands.
10. Alexandra Vilcu, **Ioana Karla Comarița,** Alina Constantin, Nicoleta Alexandru-Moise, Miruna Nemecz, Gabriela Tanko, Adriana Georgescu. **Cardiac hypertrophy in atherosclerotic cardiovascular disease: molecular mechanisms and therapeutic approaches.** 41st Annual Scientific Session Of The Romanian Society For Cell Biology International Conference Under The Auspices Of The Romanian Academy And The Academy Of Medical Sciences. December 11-13, 2024, Târgu Mureș.
11. Constantin A, **Comarița IK**, Nemecz M, Vilcu A , Georgescu A, Alexandru-Moise N. **Immune Modulation Of T Cells By Platelets And Microvesicles In Experimentally Induced Atherosclerosis.** 41st Annual Scientific Session Of The Romanian Society For Cell Biology International Conference Under The Auspices Of The Romanian Academy And The Academy Of Medical Sciences. December 11-13, 2024, Târgu Mureș.

Workshop-uri

DIABETER online workshop "A new therapeutic tool in autoimmune diabetes: Mesenchymal Stromal Cell", November 20, 2020, IBPC "Nicolae Simionescu", Bucharest, Romania.

THERAVALDIS online workshop: "Diabetes in cardiovascular diseases; pathogenic mechanisms and targeted therapies", November 27, 2020, IBPC "Nicolae Simionescu", Bucharest, Romania.

INTERA online workshop: "Recent advances in the field of obtaining nanovectors for gene transfection", April 22, 2021, IBPC "Nicolae Simionescu", Bucharest, Romania.

INTERA-1 Summer School "Encapsulation of cells and drugs: materials, procedures and applications", 13-14 May 2021, IBPC "Nicolae Simionescu", Bucharest, Romania.

Prof. Dimitris Kardassis: Lectures to the students (Lipoprotein pathways and their roles in the pathophysiology of atherosclerosis / Transcriptional Regulation of Cardiovascular Genes: Basic principles and methodologies in vitro and in vivo / Hormone Nuclear receptors: from basic biology to clinical exploitation in CVD), 14-18 November, 2024, IBPC "Nicolae Simionescu", Bucharest, Romania.

C. Brevete

Procedeu de obținere a veziculelor extracelulare modificate. Cerere de Brevet de Inventie, OSIM Nr. A/00017 din 20.01.2021. Autori: Alexandru Filippi, Nicoleta Alexandru-Moise, Alina Constantin, **Karla Comarița**, Alexandra Vîlcu, Anastasia Procopciuc, Adriana Georgescu

D. Proiecte

2018-2021 – Grant acordat de Autoritatea Națională Pentru Cercetare Științifică și Inovare, CNCS-UEFISCDI, - Proiecte Complexe Realizate în Consorţii CDI (PCCDI) - Program 1. Dezvoltarea sistemului național de cercetare dezvoltare, Subprogram 1.2. Performanță instituțională – "Proiecte de dezvoltare instituțională". Proiect nr. PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0527/Contract nr. 83 PCCDI/2018

Titlu Proiect: Dezvoltarea de BIOnanotehnologii bazate pe Veziculele Extracelulare, aplicabile în diagnosticul precoce, prognosticul și terapia bolii Aterosclerotice;

Acronim proiect: BIOVEA

Manager de proiect: Dr. CSI Adriana Georgescu

2020-2022 - Grant acordat de Autoritatea Națională Pentru Cercetare Științifică și Inovare, CNCS–UEFISCDI, Program RESURSE UMANE, Proiecte de cercetare pentru stimularea constituirii de tinere echipe de cercetare independente (TE), Competitie 2019, Număr proiect: PN-III-P1-1.1-TE-2019-0811/ Grant nr. 97/14.09.2020.

Titlu proiect: Modularea imună a celulelor T de catre plachete și microvezicule plachetare în ateroscleroza indusă experimental; rolul microRNA142-3p;

Acronim Proiect: IMPLEXIA

Manager de proiect: Dr. CSII Nicoleta Alexandru-Moise

2023-2026 - Grant acordat de Ministerul Cercetării, Inovării și Digitalizării din România - Planul Național de Recuperare și Reziliență al României. Componenta C9. SPRIJIN PENTRU SECTORUL PRIVAT, CERCETARE, DEZVOLTARE ȘI INOVAȚIE - „I8. Dezvoltarea unui program de atragere a resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare" (PNRR /2022/C9/MCID/I8)- Cod Project 93.

Titlul proiectului: Noi strategii nanoterapeutice pentru fibroza cardiacă care vizează mecanismele care stau la baza tranziția fibroblast la miofibroblast**;**

Acronim proiect: HEARTCURE

Manager de proiect: Dr. Rostyslav Bilyy

Cercetatori Principali: Adriana Georgescu, Manuela Călin, Elena Butoi

Student-doctorand

Anexa 20

MEMORIUL ȘTIINȚIFIC

Subsemnata **Mihăilă Cristina-Andreea**, student doctorand în cadrul SCOSAAR, **Școala Doctorală de Științele Vieții**, înmatriculat la data de **02.11.2020** în domeniul de studii universitare de doctorat **Biologie**, la conducătorul de doctorat **Acad. Maya Simionescu**, autor al tezei de doctorat cu titlul „**Heterogenitatea, funcționalitatea și potențialul terapeutic al neutrofilelor în infarctul miocardic**", declar următoarele activități realizate în cadrul stagiului doctoral (se vor păstra doar activitățile realizate):

A. Lista de lucrări științifice

1. Elena Barbu, **Andreea Mihaila**, Alexandru Filippi, Andra Stoenescu, Letitia Ciortan, Elena Butoi, Cristina Beiu, Marius N. Popescu, Serban Balanescu, *„Stress, Hyperglycemia, and Insulin Resistance Correlate With Neutrophil Activity and Impact Acute Myocardial Infarction Outcomes"*, Cureus, 16(7), 2024;

2. Elena Barbu*, **Andreea Cristina Mihaila***, Ana-Maria Gan, Letitia Ciortan, Razvan Daniel Macarie, Monica Madalina Tucureanu, Alexandru Filippi, Andra Ioana Stoenescu, Stefania Victoria Petrea, Maya Simionescu, Serban Mihai Balanescu, Elena Butoi, *„The Elevated Inflammatory Status of Neutrophils Is Related to In-Hospital Complications in Patients with Acute Coronary Syndrome and Has Important Prognosis Value for Diabetic Patients". Int. J. Mol. Sci., 25*, 2024;

3. Monica Madalina Tucureanu, Letitia Ciortan, Razvan Daniel Macarie, **Andreea Cristina Mihaila**, Ionel Droc, Elena Butoi, Ileana Manduteanu, *„The Specific Molecular Changes Induced by Diabetic Conditions in Valvular Endothelial Cells and upon Their Interactions with Monocytes Contribute to Endothelial Dysfunction"*. International Journal of Molecular Sciences, 25(5), 2024;

4. **Andreea Cristina Mihaila**, Letitia Ciortan, Monica Madalina Tucureanu, Maya Simionescu, Elena Butoi, *„Anti-Inflammatory Neutrophils Reprogram Macrophages toward a Pro-Healing Phenotype with Increased Efferocytosis Capacity"*, Cells, 13(3), 2024;

5. Raluca Nicu, Diana Elena Ciolacu, Anca-Roxana Petrovici, Daniela Rusu, Mihaela Avadanei, **Andreea Cristina Mihaila**, Elena Butoi, Florin Ciolacu, *„3D Matrices for enhanced encapsulation and controlled release of anti-inflammatory bioactive compounds in wound healing"*, International Journal of Molecular Sciences, 24(4), 2023;

6. Mihaela Vadana, Sergiu Cecoltan, Letitia Ciortan, Razvan D. Macarie, **Andreea C. Mihaila**, Monica M. Tucureanu, Ana-Maria Gan, Maya Simionescu, Ileana Manduteanu, Ionel Droc, Elena Butoi, *„Parathyroid hormone induces human valvular endothelial cells*

dysfunction that impacts the osteogenic phenotype of valvular interstitial cells", International Journal of Molecular Sciences, 23(7), 2022;

7. Caroline G. Sanz, **Andreea C. Mihaila**, Alexandru Evanghelidis, A., Victor C. Diculescu, Elena Butoi, Madalina M. Barsan, *„Quantification of cell oxygenation in 2D constructs of metallized electrospun polycaprolactone fibers encapsulating human valvular interstitial cells"*, Journal of Electroanalytical Chemistry, 905, 2022;

8. Sergiu Cecoltan, Letitia Ciortan, Razvan D. Macarie, Mihaela Vadana, **Andreea C. Mihaila**, Monica M. Tucureanu, Mihaela-Loredana Vlad, Ionel Droc, Mihaela Gherghiceanu, Agneta Simionescu, Dan Teodor Simionescu, Elena Butoi, Ileana Manduteanu, *„High glucose induced changes in human VEC phenotype in a 3D hydrogel derived from cell-free native aortic root"*, Frontiers in cardiovascular medicine, 8, 2021;

9. **Andreea C. Mihaila***, Letitia Ciortan*, Razvan D. Macarie, Mihaela Vadana, Sergiu Cecoltan, Mihai Bogdan Preda, Ariana Hudita, Ana-Maria Gan, Gabriel Jakobsson, Monica M. Tucureanu, Elena Barbu, Serban Balanescu, Maya Simionescu, Alexandru Schiopu, Elena Butoi, *„Transcriptional profiling and functional analysis of N1/N2 neutrophils reveal an immunomodulatory effect of S100A9-blockade on the pro-inflammatory N1 subpopulation"*, Frontiers in Immunology, 12, 2021;

10. Letitia Ciortan, Razvan Daniel Macarie, Sergiu Cecoltan, Mihaela Vadana, Monica Madalina Tucureanu, **Andreea Cristina Mihaila**, Ionel Droc, Elena Butoi, Ileana Manduteanu, *„Chronic high glucose concentration induces inflammatory and remodeling changes in valvular endothelial cells and valvular interstitial cells in a gelatin methacrylate 3D model of the human aortic valve"*, Polymers, 12(12), 2020;

B. Participări la conferințe/workshop-uri

1. 41st Annual Scientific Conference of the Romanian Society for Cell Biology (RSCB), Targu-Mures, Romania, December 11th – 13th, 2024; **Poster:** *"Anti-inflammatory N2 neutrophils reprogram macrophages to adopt a pro-healing phenotype with enhanced efferocytosis capacity"*. **Andreea C. Mihaila**, Monica Tucureanu, Letitia Ciortan, Maya Simionescu, Elena Butoi

2. **FFELASA Workshop** – „Severity Classification and Reporting under EU Directive 2010/63/EU", Heraklion, Grecia, 31 mai 2024.

3. International Conference and XXXIX Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology (RSCB), Cluj-Napoca, Romania, October 21st -23rd, 2022; **Poster**: *"N1/N2 neutrophil subtypes differentially modulate cardiac fibroblast phenotype"*. Ana-Maria Gan, Sergiu Cecoltan, Mihaela Vadana, Letitia Ciortan, **Andreea C. Mihaila**, Monica Tucureanu, Razvan Macarie, Maya Simionescu, Elena Butoi.

4. **46th FEBS Congress, The Biochemistry Global Summit, Lisbon, Portugal, July 9th - 14th, 2022**; **Poster**: *"Phenotypic and functional features of polarized N1 and N2 neutrophils*

in inflammation; their effect on macrophage polarization". **Andreea C. Mihaila**, Letitia Ciortan, Razvan D Macarie, Mihaela Vadana, Ana-Maria Gan, Monica M Tucureanu, Sergiu Cecoltan, Maya Simionescu, Elena Butoi.

5. **38th Annual scientific session of the Romanian Society for Cell Biology, Bucuresti, Romania, November 4th – 6th, 2021**; **Oral presentation:** *"Polarized N1 and N2 neutrophils acquire distinct phenotypes and functions"*.

6. **89th European Atherosclerosis Society Congress, Helsinki, Finlanda, May 30 th – June 2nd, 2021**. **Poster:** *"S100A9 blockade has potent inhibitory effects on the pro-inflammatory activation of N1 neutrophils"*. **Andreea C. Mihaila**, Letitia Ciortan, Razvan D. Macarie, Mihaela Vadana, Sergiu Cecoltan, Bogdan Preda, Ariana Hudita, Ana-Maria Gan, Monica M Tucureanu, Alexandru Schiopu, Maya Simionescu, Elena Butoi.

C. Brevete

1. Cecoltan Sergiu, Mihaela Vadana, Ciortan Letitia, Gan Ana-Maria, Tucureanu Monica Madalina, **Mihaila Cristina Andreea**, Elena Butoi. "Procedeu de obtinere a unui hidrogel din tesut cardiac functionalizat cu un agent anti-inflamator". Patent application no. A 100515 from 25.08.2022.

D. Proiecte

1. **PNRR FibroThera (2023-2026):** *"Targeting Cardiac Fibrosis in Heart Failure; Challenges and Potential Solutions Based on ncRNA Therapeutics"* – rol: membru în echipa de cercetare;

2. **PNRR HeartCure (2023-2026):** *"New nanotherapeutic strategies for cardiac fibrosis targeting the mechanisms underlying the fibroblast to myofibroblast transition"* – rol: membru în echipa de cercetare;

3. **ERA-NET NEURON (STATEMENT) (2020-2023):** Call for Joint Transnational Research Projects - *"Stroke risk prediction in atherosclerosis measuring circulating complement system proteins"* – rol: membru în echipa de cercetare;

4. **PN-III-P2-2.1-PED-2019-4906 (2020-2022**): *"Development and validation of a native cardiac hydrogel for myocardial repair post infarction"* – rol: membru în echipa de cercetare;

5. **PCCDI Complex Project nr. 13 PCCDI/2018 (INTERA) (2018-2021):** *"Intelligent therapies for non-communicable diseases based on controlled release of pharmacological compounds from encapsulated engineered cells and targeted bionanoparticles"* **INTERA 2**: *"Development of a 3D platform designed for pre-clinical drug testing composed of cells incorporated into 3D bio-matrices"* – rol: membru în echipa de cercetare;

E. Cursuri de perfecționare

1. **FELASA Training Course** – *Care and Use of Laboratory Animals: Mice, Rats and Zebrafish*, Heraklion, Crete, Greece, April–June 2024; Modules A, B, C, D; training with live animals for handling and minor invasive procedures.

Student-doctorand,
Mihăilă Cristina-Andreea

Anexa 20

MEMORIUL ȘTIINȚIFIC

Subsemnata, **Iacomi (Gheţu) Daniela-Mădălina**, student doctorand în cadrul SCOSAAR, Școala Doctorală de Ştiinţele Vieţii, înmatriculată la data de **2.11.2020** în domeniul de studii universitare de doctorat **Biologie**, la conducătorul de doctorat **Acad. Maya Simionescu**, autor al tezei de doctorat cu titlul „**Identificarea şi utilizarea factorilor secretaţi de celule cu origine mezenchimală în terapia rănilor cutanate: studii *in vitro* şi *in vivo***”, declar următoarele activități realizate în cadrul stagiului doctoral:

A. Lista de lucrări științifice

1. **Gheţu, D.-.M**, Raymond, K., Titorencu, I., Simionescu, M., „*Innovative Strategies: Use of Stromal Cell-Derived Secretome for Chronic Wound Therapy*'', International Journal of Molecular Sciences, *26*(12), 2025.
2. Sorca†, B. V., Kaya, D. A., Kaya, M. G. A., Enachescu, M., **Ghetu†, D.-M.**, Enache, L.-B., Boerasu, I., Coman, A. E., Rusu, L. C., Constantinescu, R., & Titorencu, I., „Bone Fillers with Balance Between Biocompatibility and Antimicrobial Properties'', Biomimetics, 10(2), 2025.
3. **Iacomi, D. M.**, Roşca A. M., Ţuţuianu, R., Neagu, T. P., Prună, V., Simionescu, M., Titorencu, I., *„Generation of an immortalized human adipose-derived mesenchymal stromal cell line suitable for wound healing therapy''*. International Journal of Molecular Sciences, 23(16), 2022.
4. Ţuţuianu, R., Roşca, A. M., **Iacomi, D. M.**, Simionescu, M., Titorencu, I., „*Human mesenchymal stromal cell-derived exosomes promote in vitro wound healing by modulating the biological properties of skin keratinocytes and fibroblasts and stimulating angiogenesis''*. International Journal of Molecular Sciences, 22(12), 2021.

B. Capitole de carte

1. Roșca, A.M., Ţuţuianu, R., **Ghetu, D.M.**, Titorencu, I., **2023.** Mesenchymal stromal cells for wound healing therapy: From expectations to reality. In: K.H. Haider, ed. *Handbook of Stem Cell Applications*. Singapore: Springer. DOI: 10.1007/978-981-99-0846-2_53-1.

C. Participări la conferințe/workshop-uri

Comunicări susținute la manifestări ştiinţifice internaţionale şi naţionale - autor principal

Prezentări orale (2):

1. **Gheţu D.M.,** Roşca A.M., Ţuţuianu R., Neagu T.P., Prună V., Simionescu M., Titorencu I. Aggregates of dermal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells exhibit

different characteristics: implications for regenerative therapy, „*International Conference and XXXIX Scientific Session of the Romanian Society of Cell Biology*”, 21-23 octombrie 2022, Cluj, România.
2. **Iacomi D.M.**, Roşca A.M., Ţuţuianu R., Prună V., Titorencu I., Simionescu M. Generation and characterization of an immortalized human adipose mesenchymal stromal cell line, *International Conference under the aegis of the Romanian Academy 42nd Anniversary Symposium of the Institute of Cellular Biology and Pathology ,,Nicolae Simionescu" held jointly with 38th annual scientific session of The Romanian Society for Cell Biology*, 4-6 noiembrie 2021, conferinţă online.

Postere (3):

1. **Gheţu D. M.**, Ţuţuianu R., Albu Kaya M. G., Roşca A. M., Titorencu I. Development of three-dimensional intestinal organotypic models using various collagen-based dermal equivalents", poster prezentat la conferinţa internaţională "Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering (NanoBioMat)", 25-27 iunie, 2025 (ediţia de vară), participare online.
2. **Gheţu D.M.**, Ţuţuianu R., Roşca A.M., Simionescu M., Titorencu I., Three-dimensional aggregation stimulates the pro-angiogenic properties of adult human dermal fibroblasts, poster prezentat la simpozionul aniversar cu participare internaţională *,,Aspiraţie, inspiraţie şi inovaţie în explorarea de noi frontiere în cercetarea biomedicală''* – organizat cu ocazia a 45 de ani de existenţă a Institutului de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu'', 17-18 Decembrie 2024, Bucureşti.
3. **Gheţu D.M.**, Roşca A.M., Ţuţuianu, R., Prună, V., Simionescu, M., Titorencu, I., Human dermal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells display different characteristics when cultured in 3D settings, poster prezentat la simpozionul ştiinţific anual al Institutului de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu'' cu participare internaţională *,,43 years on the never-ending road of cardiovascular discoveries"*, 8-9 decembrie 2022, Bucureşti.

Postere susținute la manifestări ştiinţifice naţionale şi internaţionale (co-autor)

1. Ţuţuianu R., **Gheţu D.M.**, Titorencu I., Roşca A.M. Mediul condiţionat derivat de la fibroblaste cultivate în sferoizi promovează regenerarea pielii pe un model murin de rană cutanată, poster prezentat la manifestaţia ştiinţifică: Simpozionul ARSAL 2024 „Evaluarea severității și conceptul 3R în proiectele ce folosesc animale în experimentare”, organizat de Asociaţia Română pentru Ştiinţa Animalelor de Laborator, găzduită de Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș", 29 martie 2024, Bucureşti.
2. Ţuţuianu R., Roşca A.M., **Gheţu D.M.**, Prună V., Albu Kaya M. Evaluation of mesenchymal cells-derived products as therapeutics for skin regeneration, poster prezentat la manifestaţia ştiintifică „1st NETSKINMODELS Network event” organizată la Bratislava, Slovacia, 14-18 februarie 2023.

3. Rădulescu A. L., **Iacomi D.M.**, Florea G., Roşca A. M., Tutuianu R., Titorencu I. Obţinerea şi caracterizarea celulelor stem mezenchimale derivate din ţesut adipos, Conferința dedicată Zilei Internaționale a Microorganismelor (ZIM), 17 septembrie 2021, Bucureşti.

D. Brevete

1. Aplicaţie OSIM nr. A/00370 (25.06.2021): „Hidrogeluri polimerice compozite cu proprietăţi antibacteriene şi cicatrizante şi procedeu de obţinere a acestora''; Autori: Simionescu M., Roşca A.M., Titorencu I.D., **Iacomi M.D.**, Ţuţuianu R., Prună V., Lasca I., Chercheriţă I.A., Neagu P.T., Mogoantă L., Mogoşanu G.D., Pirici N.D., Streba C.T., Birca A.C., Burduşel A.C., Stoica A.E., Grumezescu A.L., Chircov C.

E. Proiecte (Membră în echipă)

Proiecte naționale:

1. **PN-IV-P7-7.1-PED-2024-1446**

Proiect experimental demonstrativ

Titlul proiectului**:** Substituenţi inovativi cu structură tridimensională şi activitate antimicrobiană pe bază de colagen pentru reconstrucţia cranio-facială (*Innovative antimicrobial collagen based three dimensional scaffolds for craniofacial reconstruction*)

Perioada: 2025-2027

Coordonator: Institutul de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu", Bucureşti

Director de proiect: Dr. Irina Titorencu

Partener: LMS PLASTIC SURGERY CLINIQUE SRL – Dr. Ana Căruntu

2. **PN-III-P1-1.1-TE-2021-1344**

Proiect de cercetare pentru stimularea constituirii de tinere echipe de cercetare independente

Titlul proiectului: Îmbunătățirea proprietăților paracrine ale fibroblastelor prin agregare tridimensională pentru terapia rănilor cronice *(Enhancing the paracrine properties of fibroblasts by three-dimensional aggregation for chronic wounds therapy)* - FIBROTHER

Perioada: 2022-2024

Director de proiect: Dr. Roşca Ana-Maria

3. **PN-III-P2-2.1-PED-2021-4275**

Proiect experimental demonstrativ

Titlul proiectului: Optimizarea interacţiunii celulelor stem mezenchimale umane cu structuri biomimetice inovative cu aplicabilitate în ingineria tisulară *(Optimization of human mesenchymal stem cells interaction with innovative biomimetic structures for tissue engineering applications)* - BioMimCells

Perioada: 2022-2024

Coordonator: Universitatea Politehnica Bucureşti

Director de proiect: Dr. ing. Diana Maria Vrânceanu

Parteneri:

Institutul de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, Bucureşti - Responsabil partener: Dr. Irina Titorencu
Institutul National de Cercetare şi Dezvoltare în Optoelectronică (INOE 2000) - Responsabil partener: Dr. Alina Vlădescu

4. **PN III PCCDI 45/2018**

Proiecte complexe realizate în consorţii Cercetare Dezvoltare Inovare
Titlul proiectului: Nanostructuri bioactive pentru strategii terapeutice inovatoare (*Bioactive Nanostructures for Innovative Therapeutic Strategies*) - NANOLIFE
Perioada: 2018-2020
Coordonator: Universitatea de Medinică şi Farmacie din Craiova
Director de proiect: Dr. Laurenţiu Mogoantă
Parteneri:
Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București – Responsabil partener: Dr. Ioan Lascăr
Institutului de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu’’, Bucureşti – Responsabil partener: Dr. Irina Titorencu
Universitatea Politehnica Bucureşti - Responsabil partener: Dr. Alexandru Grumezescu

Proiecte internaționale:

1. **PNRR–III-C9-2022-I8 CF 197/15.11.2022**

Planul Național de Recuperare și Reziliență al României (*Romania’s National Recovery and Resilience Plan*) - Proiect finanţat de către Uniunea Europeană
Titlul proiectului: Îmbunătăţirea potențialului endogen anti-oxidant și de îndepărtare a colesterolului prin editare genică în boala ficatului gras; studii preclinice *(Enchancing the endogenous anti-oxidant and cholesterol removal potential by gene editing in fatty liver disease; pre-clinical studies)* - THERAGENLIV
Perioada: 2023-2026
Director de proiect: Prof. Shlomo Sasson

2. **European Cooperation in Science and Technology**

***CA21108 - European Network for Skin Engineering and Modeling* (NETSKINMODELS)**
Perioada: 2022-2026
Director de proiect: Prof. Sandrine Dubrac

F. Stagii de cercetare/perfecționare

1. Stagiu de cercetare internaţional cu o durata de 9 luni (1.09.2023-31.05.2024) realizat la Centrul Medical al Universităţii din Leiden, Ţările de Jos, beneficiind de o bursă acordată de Ministerul Educației din România (conform HG 118/2023).

G. Cursuri de perfecționare

1. Training School (Școala de formare) ‘‘3D Skin Cultures’’ organizată în cadrul acțiunii COST CA21108 – Rețeaua Europeană pentru Ingineria și Modelarea Pielii (NETSKINMODELS) – 29 iunie-2 iulie 2025, Nijmegen, Ţările de Jos.

2. Curs de formare la Universitatea de Medicină şi Farmacie ,,Carol Davila’’ din Bucureşti intitulat ,,Ştiinta animalelor de laborator’’ în perioada 30 ianuarie - 10 februarie 2023.

H. Burse obținute pe durata programului doctoral și finanţarea cercetărilor

1. Bursă acordată de către Ministerul Educaţiei pentru realizarea unui stagiu de cercetare în străinătate (conform HG 118/2023) la Centrul Medical al Universităţii din Leiden, Ţările de Jos cu durată de 9 luni (Septembrie 2023-Iunie 2024).

2. Bursă de doctorat - Şcoala de Studii Avansate a Academiei Române (2020-2023).

Student-doctorand
Iacomi (Gheţu) Daniela-Mădălina

Anexa 20

MEMORIUL ȘTIINȚIFIC

Subsemnata **Năstase-Rusu Evelyn-Gabriela**, student doctorand în cadrul SCOSAAR, Școala **Doctorală de Științele Naturii**, înmatriculat la data de **1.11.2018** în domeniul de studii universitare de doctorat **Biologie**, la conducătorul de doctorat **C.S. I Dr. Alexandrina Burlacu**, autor al tezei de doctorat cu titlul" Modificări **ale celulelor cardiace determinate de expresia aberantă a unor miR asociate cu îmbătrânirea**", declar următoarele activități realizate in cadrul stagiului doctoral (se vor păstra doar activitățile realizate):

A. Lista de lucrări științifice

1. **Rusu-Nastase EG**, Lupan AM, Marinescu CI, Neculachi CA, Preda MB, Burlacu A. MiR-29a Increase in Aging May Function as a Compensatory Mechanism Against Cardiac Fibrosis Through SERPINH1 Downregulation. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2022 doi: 10.3389/fcvm.2021.810241. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2022): 3.6 (Q2)**
2. Lupan AM*, **Rusu EG***, Preda MB, Marinescu CI, Ivan C, Burlacu A. miRNAs generated from Meg3-Mirg locus are downregulated during aging. *Aging (Albany NY)*, 2021, doi: 10.18632/aging.203208 (* contribuții egale). **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2021): 5.682 (Q1)**
3. Laudy Cherry, Sinziana Popescu,&, Carmen Alexandra Neculachi, **Evelyn-Gabriela Nastase-Rusu**, Catalina Iolanda Marinescu-Colan, Bogdan Paul Cosman, Letitia Ciortan, Fabio Martelli, Maya Simionescu, Elena Butoi, Alexandrina Burlacu, Mihai Bogdan Preda. Mesenchymal stromal cells modulate neutrophil phenotype via paracrine signals. *Stem Cell Research & Therapy,* 2025. **Factorul de impact al revistei în anul precedent publicării (2024): 7.3 (Q1)**.
4. Neculachi CA, **Nastase-Rusu EG**, Cherry L, Marinescu-Colan CI, Tastsoglou S, Cosman BP, Popa AM, Panciuc C, Zaccagnini G, Catrina SB, Simionescu M, Martelli F, Preda MB, Burlacu A. miR-210 promotes the anti-inflammatory phenotype and M2 polarization in murine macrophages. *Frontiers in Immunology.* 2025; doi: 10.3389/fimmu.2025.1633163. **Factorul de impact al revistei în anul precedent publicării (2024): 5.9 (Q1)**.
5. Preda MB, **Nastase-Rusu EG**, Neculachi CA, Zhong X, Voellenkle C, Mazure NM, Balacescu O, Ivan C, Zheng XW, Gherghiceanu M, Lebrigand K, Simionescu M, Martelli F, Mari B, Catrina SB, Burlacu A, Ivan M. miR-210 locus deletion disrupts cellular homeostasis: an integrated genetic study. *Scientific Reports*. 2025;15(1):22659. doi: 10.1038/s41598-025-07572-8. **Factorul de impact al revistei în anul precedent publicării (2024): 3,9 (Q1)**.

6. Marinescu-Colan CI, **Nastase-Rusu EG**, Neculachi CA, Martelli F, Cherry L, Preda MB, Burlacu A. From cancer to heart fibrosis - GLIPR1 highlights a subset of myofibroblasts responsive to mesenchymal stem cell therapy after myocardial infarction. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2025; doi: 10.1016/j.biopha.2025.118087. **Factorul de impact al revistei în anul precedent publicării (2024): 7.5 (Q1)**.
7. Marinescu CI, Preda MB, Neculachi CA, **Rusu EG**, Popescu S, Burlacu A. Identification of a Hematopoietic Cell Population Emerging From Mouse Bone Marrow With Proliferative Potential *In Vitro* and Immunomodulatory Capacity. *Frontiers in Immunology*, 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.698070. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2021): 7,561(Q1)**
8. Preda MB, Lupan AM, Neculachi CA, Leti LI, Fenyo IM, Popescu S, **Rusu EG**, Marinescu CI, Simionescu M, Burlacu A. Evidence of mesenchymal stromal cell adaptation to local microenvironment following subcutaneous transplantation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine,* 2020, doi: 10.1111/ jcmm.15717. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2020): 5.310 (Q2)**

B. Participări la conferințe/workshop-uri

1. **Rusu E.G.,** Burlacu A. Evaluation of the imact of alginate-based scaffolds on the mesenchymal stem cell properties in vitro. The 10th National Congress With International Participation and 36th Annual Sciencific Session of RSCB, 5-9 Iunie **2018**, Craiova, România.
2. **Rusu E.G.,** Lupan A.M, Marinescu C.I, Preda B.M, Burlacu A. Influence of aging on the quality and dynamics of mouse cardiac fibroblasts in culture. European Research Area Network (ERA-Net) on cardiovascular diseases (ERA-CVD), 13-15 Mai **2019**, Riga, Letonia.
3. **Rusu E.G.,** Lupan A.M, Marinescu C.I, Preda B.M, Burlacu A. Influence of aging on the quality and dynamics of mouse cardiac fibroblasts in culture. International Cell Culture Under Flow Meeting 2020, 18-19 Februarie **2020**, Munich, Germania-**prezentare de poster câștigătoare a „Young Scientist Award".**
4. **Rusu Evelyn-Gabriela.** Prezentare orală în cadrul simpozionului "38th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology". MiRNAs generated from Meg3-Mirg locus are downregulated during aging, 4-6 Noiembrie **2021**, București, România
5. **Rusu E.G.,** Lupan A.M, Marinescu C.I, Preda B.M, Burlacu A. MiRNAs generated from Meg3-Mirg locus are downregulated during aging. 2nd Olympiad in Cardiovascular Medicine - International Symposium on Experimental and Clinical Cardiology, 27-30 Aprilie **2022**, Heraklion, Crete

6. **Rusu Evelyn-Gabriela.** Prezentare orală în cadrul simpozionului "39th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology". Natural aging process is associated with increased miR-29a and downregulated SERPINH1 in multiple organs, 21-23 Octombrie **2022**, Cluj, România.
7. **Rusu E.G.,** Lupan A.M, Preda B.M, Marinescu C.I, Neculachi C.A, Burlacu A. Natural aging process is associated with increased miR-29a and downregulated Serpinh1 in multiple organs. Final CardioRNA COST Action Meeting, 22-24 Aprilie **2023**, Nicosia, Cyprus

C. Proiecte

1. **PNRR-III-C9-2022-I8-186** - "Targeting Cardiac Fibrosis in Heart Failure; Challenges and Potential Solutions Based on ncRNA Therapeutics (FibroThera)", director de proiect Dr. Fabio Martelli, Director ştiinţific al Laboratorului de Cardiologie Moleculară, I.R.C.C.S. Policlinico San Donato
2. **PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0172** - "Targeting innate immune mechanisms to improve risk stratification and to identify future therapeutic options in myocardial infarction" (INNATE-MI), director de proiect Acad. Maya Simionescu (colaborator al echipei de implementare în 2022)
3. **PN-III-P4-ID-PCE-2020-1340** - "Mecanisme fundamentale ale remodelării ventriculare evaluate la nivelul populaţiei de fibroblaşti cardiaci în miocardul bătrân cu infarct (Inf-OLD)", director de proiect Dr. Alexandrina Burlacu
4. **PN-III-P1-1.1-TE-2019-1893** - "MIR-210 genomic locus at the overlap between hypoxia signalling and inflammatory networks" (210-HINT), director de proiect Dr. Bogdan Preda
5. **COFUND-ERA-CVD-EXPERT-65/2017** -"Exploring new pathways in age-related heart diseases", ERA-CVD Joint Transnational Projects 2017-2020; (1) Hannover Medical School; (2) Maastricht University; (3) Humanitas Research Hospital; (4) Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III; (5) University of Lorraine; (6) Institute of Cellular Biology and Pathology (Responsabil: Dr. Alexandrina Burlacu)
6. **POC-A.1-A.1.1.4-E-2015** – "Îmbunătăţirea competitivităţii instituţionale în domeniul diabetului de tip 1 prin dezvoltarea unui concept inovator de imunoterapie cu celule stromale mezenchimale (DIABETER)", director de proiect Dr. Nadir Askenasy (Laboratorul Frankel de Transplant Experimental de Maduva Osoasa, din Centru Medical pentru Copii Schneider, Israel). Coordonator intern activităţi ştiinţifice: Dr. Alexandrina Burlacu.

D. Cursuri de perfecționare

1. Cursul internațional "CardioRNA Bioinformatics Training School" organizat de acțiunea COST CA17129 "CardioRNA", Nicosia, Cipru, 20-22 Februarie 2023.
2. Cursul internațional "10th International Course: Care and use of laboratory animals (Mice, Rats, Zebrafish)„ Creta, Grecia.

Student-doctorand

.....

Metodologia de evaluare a conducătorilor de doctorat de către studenții-doctoranzi înmatriculați la SCOSAAR

I. DISPOZIȚII GENERALE

Prezenta metodologie a fost elaborată în acord cu prevederile următoarelor acte normative

- Legea Educației Naționale nr. 1/2011, cu completările și modificările ulterioare;
- Codul studiilor universitare de doctorat, aprobat prin Hotărârea Guvernului României nr. 681/29 iunie 2011 și H.G. nr. 134/2016 pentru modificarea și completarea Codului studiilor universitare de doctorat, publicat în Monitorul Oficial nr. 182/10.03.2016;
- Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 75/2005 privind asigurarea calității educației, aprobată prin Legea nr.87/2006 cu modificările și completările ulterioare;
- Regulamentul privind organizarea și desfășurarea studiilor universitare de doctorat în cadrul SCOSAAR.

Institutele de cercetare ale Academiei Române abilitate să organizeze studii universitare de doctorat, sunt:

1. Institutul de Statistică Matematică și Matematică Aplicată „Gheorghe Mihoc-Caius Iacob”
2. Institutul de Matematică „Simion Stoilow”
3. Institutul Astronomic
4. Institutul de Chimie Fizică „Ilie Murgulescu”
5. Centrul de Chimie Organică „Costin D. Nenițescu”
6. Institutul de Geografie
7. Institutul de Geodinamică „Sabba S. Ștefănescu”
8. Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”
9. Institutul de Biochimie
10. Institutul de Biologie
11. Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau”
12. Institutul Antropologice „Francisc I. Rainer”
13. Institutul de Speologie „Emil Racoviță”
14. Institutul de Lingvistică „Iorgu Iordan - Al. Rosetti”
15. Institutul de Istorie și Teorie Literară „George Călinescu”
16. Institutul de Arheologie „Vasile Pârvan”
17. Institutul de Istorie „Nicolae Iorga”
18. Institutul de Filosofie si Psihologie „Constantin Rădulescu Motru”
19. Institutul de Etnografie și Folclor „Constantin Brăiloiu”
20. Institutul de Studii Sud Est Europene
21. Institutul Național de Cercetări Economice „Costin C. Kirițescu”
22. Institutul de Cercetare a Calității Vieții
23. Institutul de Cercetări Juridice „Acad. Andrei Rădulescu”
24. Institutul de Mecanica Solidelor
25. Institutul de Cercetări pentru Inteligență Artificială „Mihai Drăgănescu”
26. Institutul de Istorie „G. Barițiu” Cluj-Napoca
27. Institutul de Lingvistică și Istorie Literară „Sextil Pușcariu” Cluj Napoca

28. Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași
29. Institutul de Istorie „A. D. Xenopol”
30. Institutul de Arheologie Iași
31. Institutul de Informatică Teoretică Iași
32. Institutul de Chimie „Coriolan Drăgulescu” Timișoara

II. METODOLOGIA DE EVALUARE A CONDUCĂTORILOR DE DOCTORAT DE CĂTRE STUDENȚII-DOCTORANZI

Art.1. Conform prevederilor Legii 1/2011, evaluarea de către studenții-doctoranzi a activității conducătorilor de doctorat este obligatorie, desfășurându-se la nivelul fiecărui institut de cercetare organizator de doctorate. Evaluarea se desfășoară anual, pentru fiecare conducător de doctorat. De asemenea, fiecare conducător de doctorat evaluează studenții-doctoranzi pe care îi coordonează completând formularul Fișă de apreciere a activității studentului-doctorand de către conducătorul de doctorat (Anexa nr.1).

Art.2. Conducătorii de doctorat sunt evaluați de către trei factori evaluatori

- prin fișa de autoevaluare personală,
- prin studenții doctoranzi - chestionarul de evaluare
- prin evaluarea colegială

Concluziile evaluării sunt validate de către Consiliul Științific și Președintele SCOSAAR.

Art.3. La efectuarea evaluării trebuie respectate următoarele principii de bază:

a) evaluarea se bazează pe prezumția de onestitate și respect reciproc între toți participanții la procesul de evaluare;

b) evaluarea presupune cunoașterea activității conducătorului de doctorat de către studentul doctorand, bazată pe derularea programului de cercetare stabilit;

c) evaluarea se realizează de către studenți în condiții de anonimat, iar conducătorul de doctorat evaluat nu are acces direct sau indirect la identitatea evaluatorilor;

d) studenții-doctoranzi au libertatea de a participa sau nu la evaluarea conducătorului de doctorat;

e) sunt interzise orice acțiuni care ar putea manipula, condiționa sau influența, direct sau indirect, studenții în libera exprimare a opiniilor lor.

Art. 4. Institutele de cercetare organizatoare de doctorat din cadrul Academiei Române au ca obiectiv general, orientarea calității procesului educațional și de cercetare către studentul-doctorand înmatriculat într-unul din domeniile sale de cercetare doctorală. Atingerea acestui obiectiv se evaluează prin obținerea unor date și informații direct de la cei care sunt beneficiarii direcți ai ofertei educaționale doctorale și anume studenții-doctoranzi.

Art. 5. Evaluarea conducătorului de doctorat de către studenții-doctoranzi se realizează prin completarea de către aceștia din urmă a unui formular denumit – Chestionar de evaluare a conducătorilor de doctorat de către studenții-doctoranzi. (Anexa nr.2). Obiectivul prezentului chestionar este evaluarea nivelului de satisfacție a studenților-doctoranzi înmatriculați în cadrul IOSUD cu privire la suportul și activitățile de mentorat oferite studenților de către conducătorii de doctorat.

Art. 6. Evaluarea este anuală, se realiza la sfârșitul unui pachet de cursuri/seminare ale conducătorului de doctorat respectiv sau oricând se consideră necesar. Evaluarea este anonimă, singura persoană care are acces la identitatea conducătorilor de doctorat evaluați fiind persoana responsabila cu doctoratele din cadrul institutului de cercetare.

Art. 7. Informarea studenților-doctoranzi asupra conținutului chestionarului, a modului de completare și a principiilor care trebuie respectate în acest proces se realizează prin comunicare pe email. De asemenea, conducătorii de doctorat au responsabilitatea de a comunica studenților doctoranzi cu care lucrează/pe care îi coordonează sau îndrumă, la orele de curs/seminar sau la consultațiile organizate special, aspectele referitoare la prezenta metodologie

Pentru derularea metodologiei de evaluare, studenții-doctoranzi sunt invitați prin email să completeze un chestionar transmis online.

Art. 8. Rezultatele chestionarului sunt transmise persoanei responsabile cu doctoratele din cadrul institutului care va prelucra datele și va interpreta rezultatele obținute, elaborând centralizatorul punctajelor obținute de către fiecare conducător de doctorat din cadrul institutului de cercetare organizator de doctorat. Rezultatele centralizate vor fi trimise la SCOSAAR pe adresa de scosaar@acad.ro până la sfârșitul anului universitar. (Anexa nr.3)

Art. 9. Etapele referitoare la aplicarea și interpretarea chestionarelor de evaluare a conducătorilor de doctorat de către studenții doctoranzi sunt:

1. Se transmite pe adresa de email a studenților invitația de a participa la procesul de evaluare, precum și link-ul public către chestionar.
2. Studenții doctoranzi completează chestionarul, asigurându-și anonimatul;
3. Completarea chestionarului se face prin selectarea unui singur nivel pentru fiecare criteriu evaluat, care caracterizează cel mai bine activitatea persoanei evaluate.
4. După completare, se generează un raport care este transmis persoanei responsabile din cadrul institutului de cercetare organizator de doctorat în vederea prelucrării datelor și obținerii rezultatelor cantitative și calitative ale evaluării.
5. Persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul institutului de cercetare organizatoare de doctorat comunică fiecărui conducător de doctorat evaluat rezultatul obținut de acesta și transmite rezultatele centralizate către Compartimentul SCOSAAR pentru a fi validate de Consiliul Științific și Președintele SCOSAAR.
6. Directorii de Departament din cadrul Consiliului Științific vor formula recomandări de îmbunătățire a performanțelor specifice fiecărui criteriu, în cadrul unei discuții confidențiale constructive cu conducătorii de doctorat, orientate spre realizarea creșterii continue a calității prestației.
7. Datele rezultate din analizele anuale vor constitui baza unor decizii de îmbunătățire a unor situații neconforme.

Art. 10. Datele privind evaluarea conducătorilor de doctorat de către studenții doctoranzi se centralizează și se analizează în cadrul ședințelor Consiliului Științific, rezultatele analizei prezentându-se în ședințele ori de câte ori este necesar. Nivelurile de satisfacție ale studenților doctoranzi se compară cu rezultatele anterioare și se stabilesc măsuri de îmbunătățire a calității pentru activitatea următoarei ședințe.

Pe baza experienței acumulate în timp, urmează să se formuleze propuneri de îmbunătățire a metodologiei. Modificările se inițiază de către structurile implicate în organizarea și desfășurarea evaluării conducătorilor e doctorat de către studenții doctoranzi din cadrul SCOSAAR. Propunerea se înaintează către Consiliului Științific.

Orice ediție sau revizie este avizată de către Consiliu Științific și se aprobă de către Președintele SCOSAAR.

Art. 11. Autoevaluarea conducătorului de doctorat se realizează prin fișa de autoevaluare ca va include toții itemii solicitați prin O.M.E.C.nr.3651 din 12 aprilie 2021 privind aprobarea Metodologiei de evaluare a studiilor universitare de doctorat și a sistemelor de criterii, standarde și

indicatori de performanță utilizați în evaluare privind stabilirea metodologiei de evaluare a studiilor universitare de doctorat și a sistemelor de criterii, standarde și indicatori de performanță utilizați în evaluare (Anexa nr.4)

Art. 12. Fiecare conducător de doctorat își asumă prin semnătură răspunderea pentru corectitudinea informațiilor din fișa de evaluare, precum și a veridicității documentelor doveditoare atașate acesteia.

Art. 13.Conducător de doctorat completează, printează și semnează fișa de autoevaluare și o depune, împreună cu toate documentele justificative doveditoare pe un *memory stick*, dar și împreună cu documentele solicitate în format printat, la persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul institutului organizator de doctorat de care aparține. Aceasta depune documentele în format electronic și letric până în 1 decembrie a fiecărui an la sediul Academiei Române. Documentele în format electronic vor fi însoțite de TOATE dovezile suplimentare, corespunzătoare justificării fiecărui element punctat din Fișa de evaluare. Aceste documente vor fi însoțite în mod obligatoriu de un opis al documentelor. Documentele vor fi în format *pdf searchable*. Elementele care nu sunt însoțite de dovezi justificative nu vor fi declarate la acest capitol.

Art. 14. Fiecare conducător de doctorat semnează declarația ce însoțește documentele de autoevaluare prin care se obligă să respecte întocmai calendarul de evaluare.

Art. 15. Fiecare document/folder justificat va fi intitulat sugestiv conform itemului căruia i se adresează astfel încât să fie facilitată identificarea informațiilor.

De exemplu: publicații ISI_Ionescu.docx, stud_drd_alte_surse_finantare_Ionescu.docx, decizii _ comisie_susținere _Ionescu.docx, etc. Nu se exclud documentele justificative în format .pdf, dar denumirea lor trebuie să urmeze același tipic.

Art. 16. Fișa de autoevaluare include toții itemii solicitați prin O.M.E.C.nr.3651 din 12 aprilie 2021 privind aprobarea Metodologiei de evaluare a studiilor universitare de doctorat și a sistemelor de criterii, standarde și indicatori de performanță utilizați în evaluare privind stabilirea metodologiei de evaluare a studiilor universitare de doctorat (Anexa nr.5).

Fiecare doctorand își asumă prin semnătură răspunderea pentru corectitudinea informațiilor din fișa de evaluare, precum și a veridicității documentelor doveditoare atașate acesteia. Toate informațiile incluse în fișa de autoevaluare a doctorandului sunt verificate și validate, prin semnătură, de către conducătorul de doctorat.

Art. 17. Fiecare doctorand completează, printează și semnează fișa de autoevaluare individuală și o înaintează conducătorului de doctorat, împreună cu documentele toate documentele justificative doveditoare pe un *memory stick*, dar și împreună cu documentele solicitate în format printat.

Art. 18. Conducătorii de doctorat verifică informațiile din fișa de autoevaluare a fiecărui doctorand; certifică corectitudinea informațiilor și primirea tuturor documentelor doveditoare; înaintează arhivele fișelor de autoevaluare însoțite de dovezile necesare și centralizatorul fișelor de autoevaluare ale doctoranzilor către persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul institutului organizator de doctorate de care aparține.

Art. 19. Fiecare document/folder justificativ va fi intitulat sugestiv conform itemului căruia i se adresează, astfel încât să fie facilitată identificarea informațiilor.

De exemplu: publicații ISI_Ionescu.docx, stud_drd_alte_surse_finantare_Ionescu.docx, decizii _ comisie_susținere _Ionescu.docx, etc. Nu se exclud documentele justificative în format .pdf, dar denumirea lor trebuie să urmeze același tipic.

METODOLOGIA ORGANIZĂRII ŞI DESFĂȘURĂRII CONCURSULUI DE ADMITERE LA STUDIILE UNIVERSITARE DE DOCTORAT

Metodologia organizării şi desfăşurării concursului de admitere la studiile universitare de doctorat

I. Norme de organizare

Concursul de admitere, din anul 2022 pentru toate domeniile de doctorat din cadrul fiecărui institut/centru al Academiei Române, se va desfășura conform legislaţiei în vigoare:

- ***Legea Educației naționale nr. 1 /2011, cu modificările şi completările ulterioare;***
- ***Hotărârea Guvernului nr. 681/2011 privind aprobarea Codului studiilor universitare de doctorat cu modificările şi completările ulterioare;***
- ***Legea nr. 288/2004 privind organizarea studiilor universitare, cu modificările și completările ulterioare;***
- ***ORDIN Nr. 3102/2022 din 8 februarie 2022 pentru aprobarea Metodologiei-cadru privind organizarea admiterii în ciclurile de studii universitare de licenţă, de master şi de doctorat.***

Concursul de admitere la doctorat se organizează de către Academia Română prin Școala de Studii Avansate a Academiei Române, abilitată să organizeze doctorate.

Admiterea la studiile universitare de doctorat se face prin concurs în funcție de domeniul de doctorat vizat, în sesiunea **septembrie-octombrie,** informații care vor fi aduse la cunoştinţă celor interesaţi prin afişare sau postarea pe pagina web.

Studiile universitare de doctorat se organizează la forma cu frecvență.

II. Calendarul admiterii

Înscrierile și concursul de admitere la studiile universitare de doctorat se desfășoară conform calendarului de desfășurare a concursului de admitere la doctorat.

Înscrierile la colocviul de admitere se vor face în perioada 26 septembrie - 05 octombrie 2022 la I.C.A (institut de cercetări abilitat).

Colocviul de admitere la doctorat se va desfăşura în perioada 10 - 14 octombrie 2022. Rezultatele vor fi afişate pe data de 19 octombrie 2022.

III. Pregătirea desfăşurării concursului de admitere

În vederea organizării concursului de admitere la doctorat în anul universitar 2022-2023 institutele transmit către SCOSAAR situația cu numărul de locuri solicitate de către fiecare conducator de doctorat.

Consiliului Științific SCOSAAR analizează solicitările conducătorilor de doctorat privind numărul de locuri vacante finanțate cu bursă (stipendium) sau finanțate fără bursă (stipendium) pentru anul universitar 2022-2023. În această privință, se va ține cont de cerințele unei încărcări echilibrate pentru

fiecare conducător de doctorat în vederea asigurării calității studiilor universitare de doctorat. Numărul maxim de locuri cu bursă (stipendium) acordate unui conducător de doctorat este de 8. De asemenea, evaluarea presupune cunoașterea activității conducătorului de doctorat, ținând cont și de titlurile de doctor obținute de către studenții de doctorat coordonați.

Consiliul Științific SCOSAAR înaintează spre aprobare Prezidiului Academiei Române lista locurilor finanțate cu bursă (stipendium) sau finanțate fără bursă (stipendium)/conducător de doctorat/institut.

Conducătorilor de doctorat transmit institutelor de cercetare ale Academiei Române tematicile și bibliografia aferentă colocviului de admitere în vederea afișării pe pagina web a institutului. Institutele de cercetare ale Academiei Române transmit către SCOSAAR tematicile și bibliografia aferentă colocviului de admitere în vederea afișării pe pagina web.

Institutele de cercetare pot elabora şi adopta (dacă este cazul) metodologii proprii de admitere, care apoi vor fi supuse aprobării directorului de departament. Aceste metodologii vor trebui să cuprindă:

- Forma de desfăşurare a concursului de admitere, inclusiv structura probelor din cadrul acestuia şi organizarea a una sau mai multe comisii sau subcomisii de admitere;
- Tematica concursului de admitere şi bibliografia comună, dacă este cazul;
- Criteriile de evaluare şi criterii de departajare a candidaţilor;
- Pentru institutele de cercetare care organizează admiterea cu ajutorul mai multor comisii sau subcomisii, se va prevedea explicit modul în care se va realiza clasificarea tuturor candidaţilor dintr-un domeniu de doctorat pe o listă unică, în ordinea descrescătoare a mediilor generale obţinute de candidaţi, în vederea alocării locurilor cu stipendium.
- Modul de soluţionare a contestaţiilor la probele scrise, dacă este cazul;

După aprobare, aceste metodologii se afişează pe pagina web a institutelor de cercetare organizatoare de doctorat din cadrul Academiei Române, cât și pe site-ul SCOSAAR.

Institutele vor desemna comisiile de admitere şi, după caz, comisiile de soluţionare a contestaţiilor.

IV. Condiţii generale de înscriere la concurs

Înscrierea la concursul de admitere se face personal de către candidat sau de către altă persoană cu procură notarială pe baza actului de identitate.

Cu ocazia înscrierii la concursul de admitere, candidatul la studiile universitare de doctorat își alege un conducător de doctorat, dintre acei conducători de doctorat ai Academiei Române - SCOSAAR care oferă locuri de student-doctorand pentru concursul de admitere.

La colocviul de admitere la doctorat se pot prezenta candidaţi care deţin:

a) diploma de licenţă sau echivalentă a studiilor universitare de lungă durată organizate conform Legii nr. 84/1995, republicată, cu modificările şi completările ulterioare; titularii diplomelor de studii de lungă durată au dreptul să se înscrie la studii universitare de doctorat fără obligativitatea de a mai parcurge ciclul II de studii universitare de master;
b) absolvenţii cu diplomă de masterat ai ciclului de studii universitare de masterat organizate conform Legii nr. 288/2004, cu modificările şi completările ulterioare;
c) absolvenţii studiilor efectuate în străinătate şi recunoscute de către direcţiile de specialitate din cadrul Ministerului Educaţiei, ca fiind studii universitare de licență, masterat.

Înscrierile se vor face la institutele de cercetare din cadrul Academiei Române

Pentru înscriere la colocviul de admitere la doctorat, candidaţii vor prezenta următoarele documente:

- cerere de înscriere - formular tip (Anexa 1);
- certificat de naştere (copie legalizată);
- certificat de căsătorie sau alt act de schimbare a numelui (copie legalizată);
- diplomă de bacalaureat (copie legalizată);
- diplomă de licenţă şi foaie matricolă (copii legalizate);

- diploma de master şi foaie matricolă (copii legalizate);
- cartea de identitate (copie xerox);
- atestat de susţinere a unui examen de competenţă lingvistică (nivelul minim B2, conform cadrului de referinţă al Consiliului Europei);
- alte certificate care atestă pregătire universitară şi /sau postuniversitară în domeniu (copii legalizate);
- curriculum vitae - model european (Partea a I - a:CV, Partea a II - a descrierea activităţii ştiinţifice);
- lista lucrărilor ştiinţifice publicate în domeniul de studiu ales;
- lista bibliografică cu literatura de specialitate studiată pentru colocviul de admitere;
- fişa de înscriere - formular tip (Anexa 2);
- propunere privind teza de doctorat ce urmează a fi elaborată şi o scurtă prezentare a acesteia -1,2 pagini - formular tip (Anexa 3);
- adeverinţă de salariat în cazul in care candidatul este angajat;
- pentru cetăţenii străini - certificatul de competenţă lingvistică privind cunoaşterea limbii române/sau să depună certificate/diplome care să dovedească parcurgerea a cel puțin 4 ani consecutivi de studii în România

Absolvenţii de studii universitare de masterat, promoţia anului în curs, pot depune la dosar adeverinţa de absolvire a studiilor universitare de masterat.

Candidaţii care au efectuat studiile în străinătate au obligaţia de a prezenta la înscriere traducerea legalizată a diplomei obţinute şi a atestatului de recunoaştere a acestor studii eliberat de către direcţia de specialitate din cadrul Ministerului Educaţiei

Dosarele incomplete nu sunt acceptate la înscriere.

După încheierea perioadei de înscriere la concursul de admitere, opţiunea privind conducătorul de doctorat, tema de doctorat, precum şi alte informaţii, nu pot fi modificate.

O persoană poate beneficia de finanţare de la buget pentru un singur program de doctorat.

Orice alte detalii în legătură cu admiterea la studiile universitare de doctorat pot fi obţinute de la institutele din cadrul Academiei Române, în funcție de domeniul vizat, la care candidaţii doresc să susţină concursul.

SCOSAAR prin institutele de cercetare va lua măsuri pentru aducerea la cunoştinţa candidaţilor, prin afişare în termen legal, a tematicilor şi bibliografiilor pentru programele la care se organizează concurs de admitere.

V. Desfăşurarea concursului

Accesul candidaţilor în sala de concurs se face pe baza actului de identitate şi se consemnează în lista nominală prezenţa acestora. Este interzisă intrarea în sala de concurs cu telefoane mobile, calculatoare, agende electronice sau alte materiale.

Concursul de admitere la studiile universitare de doctorat se desfăşoară în cadrul institutelor de cercetare ale Academiei Române, în prezenţa comisiei de examinare. Conducătorul de doctorat poate face parte din comisia de admitere.

Admiterea propriu-zisă la studiile universitare de doctorat este procesul de selecţie a candidaţilor pentru fiecare poziţie vacantă de student-doctorand, aprobată de Prezidiul Academiei Române pentru respectivul conducător de doctorat.

Concursul are loc în limita locurilor libere ale fiecărui conducător de doctorat.

Concursul de admitere la doctorat este valabil numai pentru domeniul de doctorat pentru care s-a înscris candidatul. Concursul se organizează pe fiecare domeniu şi conducător de doctorat, pentru locurile

finanţate cu bursă (stipendium) sau finanțate fără bursă (stipendium), statutul candidaţilor admişi stabilindu-se în funcţie de opţiunea exprimată la data înscrierii şi de media la admitere.

Selecţia candidaţilor la doctorat pentru o poziţie vacantă este realizată de comisia de admitere, în limita locurilor vacante aprobate.

În urma probei de concurs, candidaţii sunt apreciaţi în raport cu nivelul de pregătire şi informare în domeniu, cu capacitatea de a evidenţia orientările majore ale cercetării în direcţia de cercetare propusă şi cu capacitatea de a formula soluţii şi căi de rezolvare (teoretică şi experimentală) a problemelor identificate.

Evaluarea candidaţilor la concurs se va realiza în raport cu următoarele criterii (Anexa 4):

1 - Nota obținută la proba orală, evaluată în raport cu:

- Definirea obiectivelor cercetării ştiinţifice (10% din evaluare);
- Metodologia cercetării (10% din evaluare);
- Rezultatele ştiinţifice ale candidatului în domeniul ales (articole, studii menţionate în CV) (20% din evaluare);
- Gandire logică: candidatul evocă date, fenomene, evenimente, răspunde organizat la subiecte complexe, dă răspunsuri logice, coerente, la subiect (10% din evaluare);
- Exprimarea clară și precisă a ideilor: răspunde exact la întrebările ce i-au fost adresate, accentuează ideile principale, formulează fraze complexe, dar comprehensibile, nu se pierde în cuvinte, termină ideea începută, ideile prezentate au o continuitate, decurgând logic (10% din evaluare);
- Nivelul de pregătire şi informare în domeniul de doctorat ales (bibliografie, tematică) (40% din evaluare).

2- Nota obținută la prezentarea proiectului tematic de cercetare va fi evaluată în raport cu:

- Contextul ştiinţific şi motivaţia temei alese (40% din evaluare);
- Rezultatele estimate (40% din evaluare);
- Calitatea prezentării proiectului (20% din evaluare).

VI. Rezultatele concursului

Media minimă de admitere la studiile universitare de doctorat cu bursă (stipendium) este de 8 (opt). La fiecare probă de concurs, candidații trebuie să obțină cel puțin media 7 (șapte). Media se calculează cu două zecimale, fără rotunjire.

Atunci când este necesară departajarea mai multor candidaţi care au aceeaşi medie se vor utiliza, în această ordine, următoarele criterii: a) media obţinută la proba de concurs; b) media generală a anilor de studii de licenţă; c) media anilor de studii de masterat.

La medii de admitere cu punctaje egale, departajarea se va realiza în funcţie de media aritmetică dintre media de absolvire a studiilor universitare de licenţă şi media de absolvire a studiilor universitare de masterat. Prin excepţie, în cazul candidaţilor care au dreptul legal de a se înscrie la concursul de admitere la studiile universitare de doctorat fără a fi urmat studii universitare de masterat, pentru departajare se va lua în considerare media de absolvire a studiilor universitare de licenţă.

Calificativul admis/respins se realizează în urma unui vot direct şi secret al membrilor comisiei de evaluare. Rezultatele votului se regăsesc în procesul verbal atașat fiecărui dosar de candidatură evaluat/ persoană (Anexa 5).

Rezultatele finale vor fi transmise către SCOSAAR pe adresa de email scosaar@acad.ro (Anexa 6)

Candidaţii care îşi retrag actele de înscriere înainte de afişarea rezultatului final al concursului sunt consideraţi eliminaţi din concurs.

Rezultatele concursului de admitere vor fi validate de către Prezidiul Academiei Române și se aduc la cunoştinţă prin afişare în termen de cel mult 48 de ore de la data finalizării acestuia.

Candidaţii declaraţi admişi sunt înmatriculaţi la studiile universitare de doctorat în baza rezultatului concursului prin decizia directorului institutului de cercetare al Academiei Române.

Dosarele candidaţilor respinşi sau ale celor care renunţă la şcolarizare se restituie candidaților, la cerere, în cel mult 48 de ore de la depunerea cererii, obligatoriu gratuit, pe baza actelor de identitate, după afișarea rezultatelor finale.

VII. Înmatricularea candidaţilor declaraţi admişi

După validarea rezultatelor admiterii de către Prezidiul Academiei Române se face înmatricularea candidaţilor declaraţi admişi.

Înmatricularea candidaţilor declaraţi admişi în urma concursului de admitere se face prin decizia directorului institutului de cercetare. După înmatriculare, studenţii doctoranzi sunt înscrişi în Registrul matricol unic (RMU) cu un număr unic valabil pentru întreaga perioadă de şcolarizare la specializarea/ programul de studii la care au fost admişi.

Candidaţii declaraţi admişi semnează contractul de şcolarizare. Aceștia vor întocmi, împreună cu conducătorul de doctorat, planul studiilor universitare de doctorat, semnate ograf.

Anexa 1

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE

DEPARTAMENTUL .....

Aprobat,

Director Departament

CERERE DE INSCRIERE

pentru colocviul de admitere la doctorat

- Sesiunea:
- Domeniul de doctorat:
- Forma pregătirii: cu frecvență „cu stipendium/fără stipendium” *
- Conducător științific:_____

CANDIDAT:

Numele și prenumele cu inițiala tatălui…….....

Prenumele părinților: tatăl……....., mama…….....

Domiciliu stabil:

Localitatea…….....Strada.…….....

....Nr.....Scara.....Bloc.....Apartament.....Sector…....….....Cod

poștal..... E-mail.....Tel...……...

Domiciliu…….....Fax.....Tel. mobil.....

Naționalitatea……...Data nașterii…….....

Localitatea……..Județul……...

Profesia de bază……..... Locul de muncă……..

Adresa instituției unde lucrează…….....

Telefon…… E-mail.....

Studii superioare absolvite (inclusiv anul absolvirii și durata studiilor):

1……

..……

2……

.....

3.....

.....

Domeniul în care candidatul a obținut licența:

1.....

2.....

3.....

Cursuri de master absolvite (inclusiv anul absolvirii și durata studiilor):

1.....

2.....

Domeniul în care candidatul a obținut specializarea (master):

1.....

2.....

Limbi străine cunoscute (scris, citit, vorbit)…….....

…….

Menționez că am susținut testul la limba de circulație internațională .....…….. .....și am obținut, conform cadrului de referință elaborat de Consiliul Europei, nivelul.....

Starea civilă …….....

Etnie.....

Stare socială specială .....

Situație medicală specială.....

Vă rog să aprobați înscrierea pentru participarea la colocviul de admitere la doctorat sesiunea ....., forma cu frecvență și „cu stipendium/fără stipendium”.

Data……

Semnătura…….

*se va alege o singură variantă (cu stipendium sau fără stipendium)

Anexa 2

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ŞCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE

DEPARTAMENTUL .....

FIŞA DE ÎNSCRIERE

1. *Institutul* _____
2. *Domeniul*_____
3. *Forma de pregătire cu frecvenţă,* „cu stipendium/fără stipendium”***** _____

	Secţiunea 1.1 **Date personale ale candidatului[1] cu cetăţenie română/străină**				
1	Numele de familie la naştere (din certificatul de naştere)				
2	Numele de familie actual (după căsătorie, înfiere etc.)				
3	Prenumele				
4	Iniţialele tatălui/mamei[2]				
5	CNP[3]				
6	Data naşterii	Anul	Luna		Ziua
7	Locul naşterii	Ţara de origine		Judeţul/ Tara[4]	Localitatea
8	Sexul	F ☐ M ☐			
9	Starea civilă[5]	Căsătorit(ă) ☐	Necăsătorit(ă) ☐	Divorţat(ă) ☐ Văduv(ă) ☐	
10	Starea socială[6] specială	Orfan de un părinte ☐ sau de ambii părinţi ☐			
		Provenit din case de copii ☐	Provenit din familie monoparentală ☐		
11	Cetăţenia	Română, cu domiciliul în România/ în străinătate			
		Alte cetăţenii			
		Cetăţenie anterioară, dacă este cazul			
12	Etnia[7]				

13	Domiciliul stabil	Țara:	Județul[8]/ (Țara[9]):	
		Localitatea:		
		Adresă (stradă, număr, bloc, scară, etaj, apartament, sector)[10]		
14	Actul de identitate / Documentul de călătorie[11]	Seria:	Numărul:	
		Eliberat de:	Data eliberării:	
		Perioada de valabilitate		
15	Alte date personale ale candidatului	Telefon,	Adresă de e-mail	
16	Candidat care se încadrează în categoria persoanelor cu dizabilități	Se bifează numai de persoanele aflate în această situație, pe bază de documente		
	Secțiunea I.3.a - Date privind pregătirea anterioară a candidatului[12] (absolvent de liceu)			
1	Studiile preuniversitare absolvite, nivel liceu	Instituția unde a absolvit		
		Țara:	Localitatea:	
		Județul:	Filiera Profilul Specializarea	
		Durata studiilor:	Anul absolvirii:	
		Forma de învățământ (Zi / Seral / FR / ID)		
2	Datele de identificare ale diplomei	Tipul (diploma de bacalaureat sau echivalentă)		
		Seria		
		Numărul		
		Emisă de		
		Anul emiterii		
		Numărul foii matricole care însoțește actul de studii		
3	Alte observații (pentru cazurile în care candidatul a absolvit studii anterioare în străinătate)	Vizarea / Recunoașterea diplomei prezentate (DGRIE - acorduri bilaterale / DGISERSD-MECTS)		
		Nr. / Serie act de recunoaștere / echivalare (eliberat de DGRIE /DERD)[13]		

<table>
<tr><td></td><td colspan="4">Secțiunea I.3.b.1 - Date privind pregătirea anterioară a candidatului[14] (absolvent de ciclu de învățământ universitar)</td></tr>
<tr><td rowspan="8">1</td><td rowspan="8">Studiile universitare absolvite</td><td>Țara:</td><td colspan="2">Localitatea:</td></tr>
<tr><td>Județul:</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td colspan="3">Denumirea instituției:</td></tr>
<tr><td colspan="3">Facultatea:</td></tr>
<tr><td colspan="3">Domeniul/ Profilul:</td></tr>
<tr><td colspan="3">Programul de studii/ Specializarea:</td></tr>
<tr><td>Titlul obținut:</td><td colspan="2">Forma de învățământ (zi/FR/ID/seral)</td></tr>
<tr><td colspan="3">Forma de finantare a studiilor (buget/ taxă):
Nr. de semestre finanțate de la buget:</td></tr>
<tr><td colspan="2">Durata studiilor (ani):</td><td>Anul absolvirii:</td></tr>
<tr><td rowspan="5">2</td><td rowspan="5">Datele de identificare ale actului de studii</td><td colspan="2">Tipul – denumirea (diplomă/diplomă de licență/echivalentă)</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">Seria</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">Numărul</td><td></td></tr>
<tr><td>Emis de:</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td colspan="2">Anul emiterii:</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="3">Numărul suplimentului la diplomă/foii matricole care însoțește actul de studii</td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="2">3</td><td rowspan="2">Alte observații (pentru cazurile în care candidatul a absolvit studii în străinătate)</td><td colspan="2">Vizarea/Recunoașterea diplomei prezentate (DGRIE - acorduri bilaterale/ DGISERSD-MECTS)</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">Nr./Serie act de recunoaștere/echivalare (eliberat de DGRIE / DERD)[15]</td><td></td></tr>
<tr><td></td><td colspan="4">Secțiunea I.3.b.2 - Date privind pregătirea anterioară a candidatului[14] (absolvent de ciclu de învățământ universitar)</td></tr>
<tr><td rowspan="8">1</td><td rowspan="8">Studiile universitare absolvite</td><td>Țara:</td><td colspan="2">Localitatea:</td></tr>
<tr><td>Județul:</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td colspan="3">Denumirea instituției:</td></tr>
<tr><td colspan="3">Facultatea:</td></tr>
<tr><td colspan="3">Domeniul/ Profilul:</td></tr>
<tr><td colspan="3">Programul de studii/ Specializarea:</td></tr>
<tr><td>Titlul obținut:</td><td colspan="2">Forma de învățământ (zi/FR/ID/seral)</td></tr>
<tr><td colspan="3">Forma de finantare a studiilor (buget/ taxă):
Nr. de semestre finanțate de la buget:</td></tr>
<tr><td colspan="2">Durata studiilor (ani):</td><td>Anul absolvirii:</td></tr>
</table>

2	Datele de identificare ale actului de studii	Tipul – denumirea (diplomă/diplomă de master/echivalentă)	
		Seria	
		Numărul	
		Emis de:	
		Anul emiterii:	
		Numărul suplimentului la diplomă/foii matricole care însoțește actul de studii	
3	Alte observații (pentru cazurile în care candidatul a absolvit studii în străinătate)	Vizarea/Recunoașterea diplomei prezentate (DGRIE - acorduri bilaterale/ DGISERSD-MECTS)	
		Nr./Serie act de recunoaștere/echivalare (eliberat de DGRIE / DERD)[15]	

[1] La înscriere sau la modificarea datelor personale (după caz)

[2] Acolo unde este cazul (de exemplu: familie monoparentală)

[3] Sau alt cod de identificare personală, pentru candidații străini

[4] Numai pentru candidații străini

[5] Poate să nu fie declarată

[6] Se aplică doar candidaților cu o situație socială specială

[7] Numai pentru candidații români (poate să nu fie declarată)

[8] Numai pentru candidații români

[9] Numai pentru candidații străini

[10] Se solicită și pentru studenții străini

[11] Documentul de călătorie numai pentru candidații străini (act de identitate pentru cetățenii UE/ SEE sau pașaport pentru stduenții străini cu altă cetățenie decât UE/ SSE)

[12] Pentru candidatul străin care vrea să studieze în România se va considera numai documentul care atestă recunoașterea/ echivalarea studiilor anterioare (document eliberat de DERD), care permit înscrierea în învățământul superior

[13]Aplicabil pentru candidații români care au finalizat studiile anterioare în străinătate sau pentru candidații străini

[14] Se aplică și pentru candidații străini

[15] Idem 13

Prin transmiterea voluntară de către dumneavoastră a oricăror date personale sau informații, vă exprimați consimțământul pentru ca aceste date să fie colectate, înregistrate, stocate, prelucrate în bazele de date ale Academiei Române, precum și transferate către instituțiile față de care Academia Română are obligații legale.

Academia Română respectă toate obligațiile legale care îi revin în legătură cu prelucrarea de date personale.

Data: **Semnătura candidatului,**

*se va alege o singură variantă (cu stipendium sau fără stipendium)

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ŞCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
DEPARTAMENTUL …….

PROPUNERE TEMĂ TEZĂ DE DOCTORAT

Numele și prenumele candidatului:
.....

Domeniul în care candidează: .....

Conducătorul științific:
.....

Tema propusă:.....
.....
.....

Importanța temei (Scurtă prezentare):

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ŞCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
DEPARTAMENTUL .....

Institutul..... Notă INTERVIU: .....
Nr. inreg

Sesiunea: .....
Nume, Inițiala tatălui, Prenumele: .....
CNP: .....
Semnătura candidatului: .....

Fișa evaluare INTERVIU

Profilul interviului	**Puncte maxime**	**Puncte obținute**
Partea I: Proba orală	***100p***	
• Definirea obiectelor cercetării științifice	10p	
• Metodologia cercetării	10p	
• Rezultatele științifice ale candidatului în domeniul ales	20p	
• Gândire logică	10p	
• Exprimare clară și precisă a ideilor	10p	
• Nivelul de pregătire și informare în domeniul de doctorat ales	40p	
Partea II: Prezentare proiectului tematic de cercetare	***100p***	
• Contextul științific și motivația temei alese	40p	
• Rezultatele estimate	40p	
• Calitatea prezentării proiectului	20p	
Total		

PREȘEDINTE, **MEMBRII COMISIEI,**
1._____
2._____
3._____

Anexa 5

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ŞCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
DEPARTAMENTUL .....

PROCES VERBAL

Încheiat astăzi ....., în urma desfășurării concursului de admitere la doctorat la forma *cu frecvență* „cu stipendium /fără stipendium” *****, în domeniul de doctorat „.....”, conducător științific .....
În baza aprobării Prezidiului Academiei Române din data de ....., referitoare la organizarea și desfășurarea admiterii la doctorat în anul universitar ....., comisia a examinat dosarele candidaților care și-au prezentat activitatea și temele pe care doresc să le dezvolte în cadrul tezelor de doctorat și a evaluat rezultatele probelor concursului:

Președinte:.....

Membri:.....

.....

.....

Numele și prenumele candidatului	Cod de atribuire	Nota obținută la examenul de ……. *	Nota obținută la proba orală	Nota obținută la prezentarea proiectului tematic de cercetare	Media obținută la colocviul de admitere la doctorat**

Ca urmare a aprecierii activității candidaților și a evaluării probelor de concurs, comisia a declarat:

ADMIȘI DOCTORANZI
BURSIERI:_____
_____

ADMIȘI DOCTORANZI FĂRĂ BURSĂ: _____
_____

RESPINȘI:_____

PREȘEDINTE, **MEMBRII COMISIEI,**

1._____
2._____
3._____

_____

**pentru absolvenții cu diplomă de licență în alt domeniu decât cel ……..sau pentru cei care au absolvit în domeniul ……., dar notele obținute la disciplinele din domeniul de doctorat, rezultate din foia matricolă, sunt sub 8,00 (opt).*
***pentru declararea candidaților admiși/respinși comisia va ține cont numai de media obținută la colocviul de admitere la doctorat, cu condiția ca media la examenul de ……. să fie de cel puțin 8,00 (opt), iar calificativul la examenul de competență lingvistică la care nivelul minim să fie B2, conform cadrului de referință al Consiliului Europei (sunt condiții eliminatorii).*
Media minimă de admitere la doctorat este 8,00 (opt). Media se calculează cu două zecimale fără rotunjire.

Anexa 6

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ŞCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
DEPARTAMENTUL .....

Institutul.....
Nr. inreg.

REZULTATELE COLOCVIULUI DE ADMITERE

- Sesiunea septembrie-octombrie 2022 –

ID Candidat	Nume și prenume candidat	Conducător de doctorat	Nota finală la probele susținute	Admis*	
				Cu stipendium	Fără stipendium

Întocmit,
Nume și prenume,

Semnătura,

Exemplu:

Admis	
Cu stipendium	Fără stipendium
DA	-
	DA

Metodologie pentru analiza și aprobarea tematicilor programelor de studii universitare de doctorat

I. Dispoziții legale

1. Legea Educației Naționale nr. 1/2011, cu modificările și completările ulterioare;
2. Hotărârea Guvernului României nr. 681 din 29 iunie 2011 privind aprobarea Codului studiilor universitare de doctorat, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea II, nr. 551 din 3 august 2011, cu modificările și completările ulterioare (inclusiv Hotărârea Guvernului României nr. 134 din 2 martie 2016 pentru modificarea și completarea Codului studiilor universitare de doctorat, aprobat prin Hotărârea Guvernului nr. 681/2011, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 182 din 10 martie 2016); Codul studiilor universitare de doctorat (HG nr. 681 din 29 iunie 2011);
3. Ordinul nr. 5229/2020 din 17 august 2020 pentru aprobarea metodologiilor referitoare la acordarea atestatului de abilitare, acordarea titlului de doctor, precum și la soluționarea sesizărilor cu privire la nerespectarea standardelor de calitate sau de etică profesională, inclusiv cu privire la existența plagiatului, în cadrul unei teze de doctorat;
4. Ordinul MEN Nr.5110/17.09.2018 privind aprobarea standardelor naționale minimale pentru acordarea titlului de doctor;
5. Ordonanța de Urgență a Guvernului României nr. 75/2005 privind asigurarea calității educației, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 87/2006, cu modificările și completările ulterioare.

II. Descrierea metodologiei

(1) Programul de pregătire bazat pe studii universitare de doctorat este un instrument pentru îmbogățirea cunoștințelor studentului-doctorand și care îi servește acestuia pentru derularea în bune condiții a programului de cercetare științifică și pentru dobândirea de competențe avansate specifice.

(2) Școala de Studii Avansate a Academiei Române **(***SCOSAAR***)** pune la dispoziția studenților-doctoranzi un program de pregătire bazat pe studii universitare avansate alcătuit din activități desfășurate în formațiuni instituționalizate de studiu, prin cursuri, seminare, laboratoare și alte asemenea activități.

(3) Școala de Studii Avansate a Academiei Române **(***SCOSAAR***)** este obligată să asigure accesul liber și neîngrădit la programul de pregătire avansată tuturor studenților-doctoranzi.

(4) Parcurgerea programului de pregătire bazat pe studii universitare avansate duce la acordarea unui număr minim de 60 de credite transferabile, repartizate pe două semestre. Programul de pregătire universitară avansată se încheie cu susținerea proiectului de cercetare științifică, elaborat de doctorand la începutul anului următor de studii, în vederea realizării tezei de doctorat.

(5) Programul de cercetare științifică cuprinde minimum 120 de credite, repartizate pe patru semestre.

(6) Creditele obținute într-un program anterior de doctorat pot fi recunoscute ca echivalente cu cele dintr-un program de pregătire prezent. Echivalarea este propusă de către conducătorul de doctorat și se aprobă de către Directorul de Departament.

(7) Participarea unui anumit student-doctorand la programul de pregătire bazat pe studii universitare avansate și alegerea elementelor de studiu (din pachetul de discipline opționale, după caz, în funcție de specificul domeniul de doctorat) din cadrul acestuia, care trebuie urmate sunt stabilite de către conducătorul de doctorat prin consultare cu studentul-doctorand.

(8) Responsabilitatea asupra structurii, conținutului, desfășurării și organizării programului de cercetare științifică al studentului-doctorand revine conducătorului de doctorat.

(9) Conducătorul de doctorat este direct responsabil pentru parcursul științific al studentului-doctorand, fiind obligat să ia toate măsurile necesare pentru a-i asigura acestuia condițiile, cunoștințele și informațiile care să maximizeze șansele finalizării programului de doctorat.

(10) Programele de studii universitare de doctorat asigură formarea de competențe profesionale (de conținut, cognitive și de cercetare) în domeniile de specialitate, precum și a unor competențe transversale. Conducătorii de doctorat și membrii comisiei de îndrumare analizează fișele disciplinelor propuse în planurile de învățământ prin prisma asigurării competențelor profesionale și transversale. Aceștia pot formula propuneri care urmăresc îmbunătățirea/actualizarea conținutului programelor de studii universitare de doctorat.

(10.1) Sunt calificate drept competențe profesionale următoarele competențe specifice domeniului:

a) dobândirea de cunoștințe avansate și abilități practice în domeniul de interes, în limba română;

b) capacitatea de identificare, formulare și soluționare a problemelor de cercetare;

c) stăpânirea metodelor și tehnicilor de cercetare avansată;

d) cunoștințe privind managementul proiectelor de cercetare;

e) stăpânirea procedeelor și soluțiilor noi în cercetare;

f) abilități de documentare, elaborare și valorificare a lucrărilor științifice;

g) abilități lingvistice la nivel academic în limbi de circulație internațională necesare documentării și elaborării de lucrări științifice;

h) înțelegerea și capacitatea de aplicare a principiilor și valorilor eticii cercetării științifice în domeniul respectiv.

(10. 2) Se consideră drept competențe transversale următoarele:

a) competențe de comunicare, scrisă și orală, în domeniul științei și culturii;

b) competențe lingvistice avansate în limbi de circulație internațională;

c) utilizarea tehnologiei informației și comunicării;

d) abilități de inter-relaționare și de lucru în echipă;

e) cunoștințe de management al resurselor umane, materiale și financiare;

f) calități de conducere;

g) cunoștințe privind managementul carierei, precum și însușirea de tehnici privind căutarea unui loc de muncă și de creare de locuri de muncă pentru alții;

h) cunoștințe privind managementul riscului, crizei și al eșecului;

i) cunoștințe privind utilizarea legislației în domeniul drepturilor de proprietate intelectuală;

j) capacități de antreprenoriat economic, tehnologic și social.

III. Responsabilități

Responsabilitatea aplicării prezentei metodologi revine atât conducerii IOSUD / IOD, cât și tuturor conducătorilor de doctorat.

(11) Ediția de față a prezentei metodologii a fost aprobată în ședința Prezidiului Academiei Române din data de……

METODOLOGIA PRIVIND ACORDAREA BURSELOR PENTRU STUDII UNIVERISTARE DE DOCTORAT

I. DISPOZIȚII GENERALE

Art.1. Prezenta metodologie are ca baze legale prevederile Legii educației naționale 1/2011, Codului studiilor universitare de doctorat (HG 681/2011), Regulamentului de desfăşurare a studiilor universitare de doctorat din cadrul Școlii de Studii Avansate a Academiei Române și contractului de studii universitare de doctorat cu stipendiu.

Institutele de cercetare ale Academiei Române care au calitatea de a organiza susținerea tezelor de abilitare sunt:

1. Institutul de Statistică Matematică şi Matematică Aplicată”Gheorghe Mihoc-Caius Iacob”
2. Institutul de Matematică "Simion Stoilow"
3. Institutul Astronomic
4. Institutul de Chimie Fizică „Ilie Murgulescu”
5. Centrul de Chimie Organică ”Costin D. Nenițescu"
6. Institutul de Geografie
7. Institutul de Geodinamică ”Sabba S. Ștefănescu”
8. Institutul de Biologie şi Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"
9. Institutul de Biochimie
10. Institutul de Biologie
11. Institutul de Virusologie “Ștefan S. Nicolau”
12. Institutul Antropologie "Francisc I. Rainer"
13. Institutul de Speologie ”Emil Racoviţă”
14. Institutul de Lingvistică ”Iorgu Iordan - Al. Rosetti”
15. Institutul de Istorie și Teorie Literară "George Călinescu”
16. Institutul de Arheologie "Vasile Pârvan"
17. Institutul de Istorie "Nicolae Iorga"
18. Institutul de Filosofie si Psihologie ”Constantin Rădulescu Motru”

19. Institutul de Etnografie şi Folclor ”Constantin Brăiloiu”
20. Institutul de Studii Sud Est Europene
21. Institutul Național de Cercetări Economice ”Costin C. Kirițescu”
22. Institutul de Cercetare a Calității Vieții
23. Institutul de Cercetări Juridice „Acad. Andrei Rădulescu”
24. Institutul de Mecanica Solidelor
25. Institutul de Cercetări pentru Inteligență Artificială ”Mihai Drăgănescu”
26. Institutul de Istorie "G. Bariţiu" Cluj-Napoca
27. Institutul de Lingvistică și Istorie Literară “Sextil Pușcariu” Cluj Napoca
28. Institutul de Chimie Macromoleculară ”Petru Poni” Iași
29. Institutul de Istorie "A. D. Xenopol"
30. Institutul de Arheologie Iaşi
31. Institutul de Informatică Teoretică Iași
32. Institutul de Chimie Timișoara ”Coriolan Drăgulescu"

Art.2. Metodologia se aplică studenților doctoranzi admişi.

Art.3. Bursa de studii doctorale se poate acorda de la bugetul de stat, din venituri proprii, donaţii sau sponsorizări.

Art.4. Numărul de locuri cu stipendiu se aprobă de Prezidiul Academiei Române

Art.5. Cuantumul burselor, reprezintă sume nete transferate în cont de card a studentului-doctorand, în condițiile legii. Valoarea stipendiului este de 1236 lei.

Art.6. Durata bursei este de 6 semestre (3 ani), iar in cazul studentilor doctoranzi la Medicină şi Medicină Veterinară de 8 semestre (4 ani), începând cu data de întâi noiembrie a fiecărui an.

Art.7. Studentul-doctorand va primi bursa/stipendiul lunar pe baza unui raport asumat de către conducătorul de doctorat prin semnătură.

Art.8. Studentul-doctorand pentru a primi stipendiu trebuie să:

- să obţină minimum nota 8 la toate examenle și calificativul ***Foarte bine*** sau **Bin**e la examenele din primul an, la toate rapoartele de cercetare și la orice evaluare prevăzută în planul individual de studii;

- desfășoare în cadrul institutului lucrările specifice domeniului de cercetare conform planului de lucru stabilit de comun acord cu conducatorul de doctorat;

Art.9. În cazul în care studentul-doctorand nu își îndeplinește obligațiile prevăzute la art.8 din prezenta metodologie plata bursei/stipendiului încetează.

II. METODOLOGIA ŞI CRITERIILE DE ACORDARE A BURSELOR

Art.10 (a) Bursele de studii doctorale se atribuie pentru candidații admişi la studii doctorale în funcție de numărul de locuri aprobate de Prezidiu Academiei Române, în ordinea mediei de admitere.

(b) Doctorandul va primi stipendiul lunar pe baza unui raport privind prezența și activitatea sa, raport ce va fi asumat de către conducătorul de doctorat prin semnătură. La finele fiecărei luni de desfăsurare a studiilor doctorale, conducătorul de doctorat face o evaluare a activității desfăşurate de fiecare student-doctorand printr-un raport de activitate **(Anexa nr.1**) prin analiza rapoartelor de activitate ştiințifică lunare a doctoranzilor şi hotărăşte atribuirea în continuare a bursei doctorale. Dacă studentul-doctorand nu şi-a susținut examenele, proiectele de cercetare, rapoartele de cercetare ştiințifică, a luat o notă inferioară notei 8 sau dacă acestea au fost apreciate cu calificativul Satisfăcător bursa se sistează.

(d) În cazul nesusținerii examenelor, proiectelor de cercetare, rapoartelor de activitate ştiințifică sau dacă acestea au fost apreciate cu o notă inferioară notei 8, calificativul Satisfăcător conducătorul de doctorat anunță persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul institutelor privind încetarea bursei pe baza Raportului de activitate.(**Anexa nr.1**) Persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul institutului organizator de doctorat al Academiei Române va anunța Compartimentul Contabilitate al I.O.D.-ului pentru luarea măsurilor legale privind sistarea bursei și va întocmi un act aditional la contractual de studii. (**Anexa nr. 2)**

(e) Persoana responsabilă cu doctoratele din institutul organizator de doctorat (I.O.D.) va anunța pe adresa de e-mail scosaar@acad.ro până în data de 5 a lunii următoare Compartimentul SCOSAAR transmițând situația lunară a doctoranzilor bursieri. (**Anexa nr. 3**)

Art.11. Bursa se suspendă automat pentru perioadele de întrerupere legală a studiilor de doctorat sau în situațiile de încălcare de către doctorand a clauzelor contractului de studii doctorale.

Art.12. Bursa poate înceta și la cererea studentului-doctorand. Studentul-doctorand depune la institutul organizator de doctorat (I.O.D.), cererea de sistare a bursei (**Anexa nr. 4**), avizată de conducătorul de doctorat și aprobată de Directorul de Department. Cererea va fi verificată de persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul institutului organizator de doctorat al Academiei Române. După verificare va primi număr de ieșire de la registratura institutului și i se va atașa actul aditional. (**Anexa nr. 2**)

Art.13. Cererea va fi înregistrată la Registratura Academiei Române de către persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul institutului de cercetare și va fi depusă la Compartimentul Şcolii de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR). Aceasta va fi înaintată Președintelui SCOSAAR pentru aprobare.

Art.14. Doctoranzii care participă la un stagiu de studii doctorale în străinătate își pot păstra bursa de doctorat pe perioada stagiului în străinătate, cu acordul conducatorului de doctorat, avizul Consiliului științific si cu aprobarea Președintelui SCOSAAR. În acest caz, perioada petrecută în străinătate nu se consideră întrerupere a doctoratului, cu condiția îndeplinirii cerințelor cu privire la prezență și calificative.

Metodologie privind doctoratul în cotutelă

I. Documente de referință

Art. 1. Cotutela se desfășoară în conformitate cu prevederile:

● Legea Educației Naționale 1/2011, cu completările și modificările ulterioare;
● Hotărârea de Guvern nr. 681/2011 privind aprobarea Codul studiilor universitare de doctorat, cu modificările ulterioare, cu completările și modificările ulterioare;
● Regulamentul de organizare a studiilor universitare de doctorat în cadrul Școlii de Studii Avansate a Academiei Române (*SCOSAAR*)

II. Metodologie privind doctoratul în cotutelă

Art. 2. Cotutela în cazul studiilor universitare de doctorat reprezintă desfășurarea activității specifice ciclului de învățământ sub îndrumarea simultană a doi conducători de doctorat.

Art. 3. Doctoratul în cotutelă poate fi organizat astfel:

a. Cotutelă externă (națională sau internațională): Studentul doctorand din cadrul Școlii de Studii Avansate a Academiei Române **(**SCOSAAR**)** este îndrumat de un conducător de doctorat din cadrul SCOSAAR și de către un conducător de doctorat dintr-o altă țară (cotutelă internațională) sau alt IOSUD din România (cotutelă națională), pe baza unui acord între instituțiile organizatoare implicate.

b. Cotutelă internă: Ambii conducători de doctorat fac parte din SCOSAAR, dar au domenii diferite de studiu sau din cadrul aceluiași domeniu.

Art. 4. În cazul cotutelelor naționale:

a. Instituția în care este înmatriculat doctorandul devine IOSUD principală, iar instituția care participă la îndrumarea doctorandului devine IOSUD parteneră.

b. În cazul doctoratului în cotutelă se definește un conducător de doctorat principal, membru al IOSUD principal.

Art. 5. Acordul dintre instituții pentru o cotutelă externă specifică cerințele organizării și desfășurării activității doctoratului în fiecare dintre cele două IOSUD-uri, în concordanță cu rolul pe care fiecare parte îl asumă în cadrul cotutelei, inclusiv obligațiile financiare ale acestora și respectând legislația care se aplică IOSUD-urilor și metodologiile/procedurile specifice pentru studii doctorale ale acestor IOSUD-uri.

Art. 6. a. Încheierea acordului de cotutelă se face pe parcursului anului I de studiu (Anexele 1-8).

b. În cazul în care conducătorul de doctorat al studentului înmatriculat la SCOSAAR dorește să inițieze încheierea unui acord de cotutelă în vederea derulării studiilor de doctorat va înainta Consiliului Științific pentru analiză, oportunitatea și necesitatea acestui acord.

c. Acordul de cotutelă este avizat de conducătorul de doctorat, de Consilierul Juridic, de Directorul de Departament, Directorul Institutului de cercetare organizator de doctorate – IOD, de Președintele SCOSAAR și este aprobată de Președintele Academiei Române.

Art. 7. Pentru încheierea acordului de cotutelă națională, al doilea conducător de doctorat transmite, electronic următoarele documente persoanei responsabile de doctorat din cadrul IOD-ului:

- Curriculum vitae,
- Lista lucrărilor publicate,
- Atestatul de abilitare pentru conducere doctorat sau, după caz, ordinul ministrului

educației prin care se acordă calitatea de conducător de doctorat,

- Adeverință din care să rezulte că are un contract de muncă cu IOSUD partener indicând postul didactic/de cercetare.

Art. 8. În cazul doctoratului în cotutelă internațională a studenților înscriși la SCOSAAR, dacă legislația națională aplicabilă pentru studiile universitare de doctorat prevede înmatricularea și la IOSUD în cotutelă, SCOSAAR nu pierde drepturile sale privind rolul principal de IOSUD în cadrul programului de studii de doctorat, aspect ce se va menționa obligatoriu în acordul de cotutelă.

Art. 9. a. Comisia de îndrumare include ambii conducători de doctorat.

b. Comisia pentru susținerea publică din România a unei tezei de doctorat elaborate în cotutelă include ambii conducători de doctorat.

c. Programul de pregătire al studentului-doctorand este agreat de către ambii conducători de doctorat.

d. Modificările în privința derulării programului de studii de doctorat pentru care s-a încheiat acordul de cotutelă, precum schimbarea conducătorului de doctorat, schimbarea titlului tezei de doctorat, data susținerii publice etc. se face cu respectarea prevederilor legale în vigoare și cu acordul ambilor conducători de doctorat

Art. 10. Acordurile de cotutelă internaționale vor fi redactate într-o limbă de circulație internațională.

Art. 11. În cazul în care un conducător de doctorat din SCOSAAR este solicitat pentru îndrumare în altă instituție prin acord de cotutelă națională sau internațională, în rol partener conducătorul respectiv prezintă spre analiză către Consiliul Științific, acordul propus de către IOSUD-ul unde este înmatriculat doctorandul pentru care se solicită cotutela. Acordul de cotutelă este avizat de conducătorul de doctorat, de Consilierul Juridic, de Directorul Institutul organizator de doctorat, Directorul de Departament, Președintele SCOSAAR și este aprobat de către Președintele Academiei Române.

Art. 12. În cazul unei cotutele interne se încheie între conducătorii de doctorat un acord de cotutelă, care este avizat de directorul de Departament, aprobat de Președintele SCOSAAR și Președintele Academiei Române prin care se stabilesc responsabilitățile fiecărui conducător de doctorat.

Art. 13.

a. În cazul unei cotutele naționale și internaționale în care SCOSAAR este instituția principală, susținerea publică va avea loc la institutul organizator de doctorat din cadrul SCOSAAR.

b. O excepție este posibilă în cazul în care susținerea se realizează on-line.

Art. 14. Diploma va fi emisa de IOSUD-ul principal.

LISTA ANEXELOR

Anexa 1 Cerere de cotutelă
Anexa 2 Model de acord preliminar al conducătorului de doctorat din instituția parteneră (varianta în limba română)
Anexa 3 Model de acord preliminar al conducătorului de doctorat din instituția parteneră (varianta în limba engleză)
Anexa 4 Model de acord de cotutelă de teză doctorat
Anexa 5 Model Acord de cotutelă interna - interdisciplinară
Anexa 6 Co-tutelle Agreement of Doctoral Thesis
Anexa 7 Agreement of Academic Cooperation
Anexa 8 Convention de Cotutelle Internationale de These

METODOLOGIA DE SCHIMBARE A CONDUCĂTORULUI DE DOCTORAT ȘI MEDIERE A CONFLICTELOR

I.DISPOZIȚII LEGALE

- Legea Educației Naționale nr. 1/2011, cu completările și modificările ulterioare;
- Codul studiilor universitare de doctorat, aprobat prin Hotărârea Guvernului României nr. 681/29 iunie 2011 și H.G. nr. 134/2016 pentru modificarea și completarea Codului studiilor universitare de doctorat, publicat în Monitorul Oficial nr. 182/10.03.2016;

II. DESCRIEREA METODOLOGIEI

Art. 1. Metodologia stabilește modalități în care se poate schimba conducătorul de doctorat al unui student-doctorand și atunci când este cazul medierea în vederea soluționării pe care amiabilă a conflictelor între studenții-doctoranzi și conducătorii de doctorat, condiții de neutralitate, imparțialitate și confidențialitate.

Art. 2. În Școala de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR) schimbarea conducătorului de doctorat se poate face numai în același domeniu de doctorat în următoarele condiții:

a) Conducătorul de doctorat a împlinit vârsta de pensionare și nu dorește sa își continue activitatea;
b) Conducătorul de doctorat se retrage din Școala de Studii Avansate a Academiei Române;
c) Conducătorul de doctorat este indisponibil pe o perioadă de peste un an;
d) La solicitarea comună a conducătorului de doctorat și a studentului-doctorand în baza unor motive întemeiate;
e) Să solicite SCOSAAR schimbarea conducătorului de doctorat în cazul în care acesta nu își respectă obligațiile legale sau contractuale ori pentru alte motive care vizează raportul de îndrumare dintre conducătorul de doctorat și studentul-doctorand
f) La solicitarea motivată a studentului-doctorand în cazul în care conducătorul de doctorat i-a fost retrasa calitatea de conducător de doctorat din cadrul SCOSAAR;
g) În cazul decesului conducătorului de doctorat;
h) În cazuri de forță majoră.
i)

Art. 3 În toate situațiile de mai sus, schimbarea conducătorului de doctorat se face cu aprobarea Consiliului Științific și a Președintelui SCOSAAR, numai cu acordul în scris a noului conducător de doctorat.

Art. 4. Etapele schimbării conducătorului de doctorat și medierea conflictelor:

a) Depunerea cererii de schimbare a conducătorului de doctorat;
b) Analiza cererii și emiterea deciziei privind cererea de schimbare a conducătorului la nivelul Consiliului Științific

c) Medierea conflictelor între studenții-doctoranzi și conducătorii de doctorat la nivelul Consiliului Științific.

Art. 5. Descrierea etapelor

1. Etapa de depunere a cererii de schimbare a conducătorului de doctorat cuprinde :
   - ✓ Studentul doctorand completează cererea (Anexa nr. 1) în care menționează motivul pentru care solicită schimbare a conducătorului de doctorat și o depune la institutul organizator de doctorat.
   - ✓ Cererea va cuprinde avizul de principiu al noului conducător de doctorat și va fi depusă cu cel puțin 30 de zile înainte de producerea efectelor

2. Etapa de informare și de transmitere a cererii de schimbare a conducătorului de doctorat către directorul de departament
   - ✓ Persoana responsabilă de doctorate din cadrul institutului de cercetare organizator de doctorate primește și înregistrează cererea de schimbare a conducătorului de doctorat;
   - ✓ Transmite cererea în cel mult 2 zile de la înregistrarea cererii prin e-mail conducătorului de doctorat și originalul cererii îl depune la departamentul de care aparține institutul.

3. Etapa de semnare de către Directorul de Departament și a Președintelui SCOSAAR a cererii de schimbare a conducătorului de doctorat pe baza hotărârii Consiliului Științific
   - ✓ Directorul de Departament convoacă în cel mult 10 zile Consiliul Școlii Doctorale în vederea analizării cererii de schimbare a conducătorului de doctorat;
   - ✓ Pe baza hotărârii Consiliului Științific privind solicitarea studentului-doctorand, Directorul de Departament și Președintele SCOSAAR va semna (aprobat/ neaprobat) cererea solicitantului, iar în maxim 3 zile lucrătoare de la data ședinței Consiliului Științific se va emite decizia de aprobare sau nu a modificării conducătorului de doctorat. Dacă Consiliul Științific nu aprobă cererea de schimbare a conducătorului de doctorat, se motivează respingerea cererii;
   - ✓ Compartimentul SCOSAAR și Studii Postdoctorale comunică prin e-mail persoanei responsabile cu doctoratele din cadrul IOD, aceasta transmite prin e-mail părților implicate: celor doi conducători de doctorat și studentului-doctorand decizia Consiliului Științific. Dacă solicitarea schimbării conducătorului de doctorat a intervenit în contextul izbucnirii unui conflict între studentul-doctorand și conducătorul de doctorat, urmează medierea conflictului în vederea soluționării pe cale amiabilă.

4. Medierea conflictelor între studenții-doctoranzi și conducătorii de doctorat la nivelul Consiliului Științific
   - ✓ Consiliul Științific desemnează o comisie pentru medierea conflictelor alcătuită din trei conducători de doctorat dintre care cel puțin unul este din domeniul de doctorat în cadrul căruia a apărut conflictul.

- ✓ Comisia pentru medierea conflictelor are la dispoziție 10 zile pentru a convoca la dialog părțile implicate. În urma analizării situației și pozițiilor exprimate, comisia va propune soluții în vederea rezolvării pe cale amiabilă a conflictului. Rezultatele lucrărilor Comisei și soluțiile propuse pentru rezolvarea pe cale amiabilă a conflictului sunt consemnate într-un Referat semnat de ambele părți implicate și membrii comisiei de mediere.
- ✓ Comisia pentru medierea conflictelor transmite Referatul scanat prin e-mail Președintelui SCOSAAR și Consiliului Științific
- ✓ Președintele SCOSAAR convoacă Consiliul Științific în termen de 10 zile pentru analiza referatului comisiei de mediere și decizie asupra măsurilor ce se impun a fi luate. Hotărârea este transmisă Compartimentului SCOSAAR și Studii Postdoctorale.
- ✓ Decizia Consiliului Științific se transmite spre aprobare Președintelui SCOSAAR și se comunică prin e-mail tuturor părților implicate.

Art. 6. Decizia Consiliului Științific va avea în vedere prioritar necesitatea ca studentul-doctorand să poată finaliza programul de doctorat.(art. 29. alin. 3).

Art. 7. Școala de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR) prin compartimentele implicate dispune de bază materială pentru desfășurarea activităților cu privire la procedura de schimbare a conducătorului de doctorat și/sau de mediere a conflictelor între studenții-doctoranzi și conducătorii de doctorat. Pentru desfășurarea activităților care se înscriu în specificul acestei proceduri nu sunt necesare resurse materiale sau dotări speciale, ci cele care sunt în dotarea curentă a compartimentelor și aflate în utilizarea curentă.

Metodologia
privind transferul rezultatelor formative între programe de studii

Capitolul 1
Prevederi generale

Art. 1.1. În conformitate cu prevederile Ordinului Ministrului Educației și Cercetării nr. 3617/2005 privind aplicarea generalizată a Sistemului European de Credite Transferabile și metodologia Sistemului European de Credite Transferabile[1], prezentul Regulament stabilește *cadrul general de rezolvare a solicitărilor de transfer al rezultatelor profesionale* obținute de studenții-doctoranzi ca urmare a promovării unor discipline cuprinse în planurile de studii universitare.
Scopul urmărit este încurajarea mobilității studenților (în conformitate cu principiile sistemului Bologna), în condițiile omogenizării profilului academic al studenților mobili și asigurării finalităților formative stabilite de SCOSAAR.
Regulamentul urmează principiile Sistemului European de Credite Transferabile, conform cărora:
- disciplinele sunt caracterizate prin finalități formative exprimate în termeni de competențe, respectiv ce va ști, va înțelege și va fi capabil să facă studentul-doctorand după promovarea disciplinei;
- creditele alocate unei discipline măsoară cantitatea de muncă necesară studentului mediu pentru atingerea finalităților formative proprii acelei discipline; 1 credit ECTS = 25-30 ore muncă necesară studentului, incluzând timpul alocat predării (ore-contact), studiului individual și procedurilor de evaluare;

[1] ECTS Users' Guide, European Commision, Directorate-General for Education and Culture, Bruxelles, 2009. Vezi http://www.iaim.ro/universitatea/ects/ECTS_Users_Guide_2009.pdf

- acordarea creditelor confirmă dobândirea competențelor proprii disciplinei de către studentul promovat, respectiv atingerea finalităților formative;
- transferul creditelor aferente unor discipline cuprinse în planuri de învățământ diverse implică *echivalențafinalităților formative* proprii disciplinelor respective;
- indiferent de sistemul de notare (ce diferă de la țară la țară), nota obținută exprimă *performanța* studentului în atingerea finalităților formative și situarea lui într-o ierarhie a grupului evaluat în aceleași condiții (v.scala notelor ECTS European Credit Transfer System)

Art. 1.2. Transferul creditelor se face pe baza evaluării comparative a finalităților formative aferente disciplinelor promovate de student, cu cele ale disciplinelor din planul de învățământ al programului de studii către care se solicită transferul.

Art. 1.3. In cazul în care *nu* există un acord prealabil între instituții privind recunoașterea creditelor, transferul acestora este posibil numai dacă facultatea care acordă calificarea recunoaște creditele și finalitățile formative asociate lor ca fiind relevante pentru programul de studii vizat de transfer, pe baza unor informații complete privind competențele dobândite și modul de evaluare, certificate oficial de instituția care a acordat creditele.

Art. 1.4. Creditele corespunzătoare unor discipline cu finalități formative echivalente sunt recunoscute, transferate și acumulate în portofoliul studentului-doctorand, indiferent de anul de studii în care se regăsesc respectivele discipline în planul studiilor universitare de doctorat către care se solicită transferul.

Art. 1.5. Având în vedere finalitatea formativă distinctă a ciclurilor de studii universitare de doctorat, *transferul de credite poate fi operat numai în cadrul aceluiași ciclu de studii universitare*. (cf. Ordinului Ministrului Educației și Cercetării nr. 3617/2005, Art.5, par.2)

Art. 1.6. Studenții-doctoranzi înmatriculați la studii de doctorat într-un anumit domeniu la alte instituții de învățământ superior acreditate se pot transfera la programe de studii oferite de SCOSAAR *numai în cadrul aceluiași domeniu*.

Art. 1.7. Aprobarea transferului unui student-doctorand de la un program de studii universitare de doctorat la altul este condiționată de posibilitatea echivalării a min. 2/3 din creditele acumulate (respectiv echivalența a min. 2/3 din competențele dobândite de student- doctorand cu cele specifice programului de studii către care solicită transferul). Poate solicita transferul la un alt program de studiu numai studentul-doctorand care a absolvit cel puțin primul an și a acumulat min. 2/3 din creditele corespunzătoare anilor studiați în programul unde este înmatriculat.

Art. 1.8. In cazul transferării studentului-doctorand, disciplinele neacoperite prin transfer de credite se constituie ca „diferențe" în sarcina studentului-dotorand transferat, urmând ca el să obțină creditele aferente acestor discipline prin frecventarea și promovarea disciplinelor respective, în plus față de activitățile didactice curente.

În cazul în care rezultă ca diferențe mai mult de 20 de credite, acestea pot fi recuperate pe parcursul mai multorani de studii consecutivi, conform unui plan de studii al studentului-doctorand, cu respectarea regulamentelor aplicabile.

Capitolul 2
Prevederi speciale

Art. 2.1. În cazul perioadelor de studii efectuate pe cont propriu în instituții de învățământ superior din străinătate care au adoptat Sistemul European de Credite Transferabile, recunoașterea rezultatelor obținute va avea în vedere echivalența finalităților formative ale fiecărei discipline promovate cu cele ale disciplinelor din programul de studii din cadrul SCOSAAR pentru care se solicită echivalarea, pe baza metodologiei ECTS (ECTS Users' Guide).

Art. 2.2. În cazul perioadelor de studii efectuate în afara spațiului academic european, recunoașterea rezultatelor va avea în vedere echivalența finalităților formative între disciplinele promovate la universitățile din străinătate și cele ale disciplinelor din programul de studii din cadrul SCOSAAR pentru care se solicită echivalarea; stabilirea numărului de credite se va baza pe extrapolarea metodologiei ECTS cu referire la raportul între numărul de credite și efortul studentului-doctorand precum și pe corespondența între finalitățile formative echivalate și numărul de credite corespunzătoare lor în cadrul programului de studii către care se solicită transferul.

Art. 2.3. Stabilirea corespondenței între notele obținute de studenții-doctoranzi în universități din străinătate cu alte sisteme de notare decât cel din România, și notele din sistemul național, se va baza pe metodologia prevăzută în ECTS Users' Guide (ECTS Grading Scale).

Art. 2.4. Conform prevederilor Legii 1/2011, Art. 147, alin. (2), studiile efectuate în cadrul programului de studii întrerupt ca urmare a exmatriculării datorate încălcării prevederilor Codului de etică și deontologie universitară nu pot fi recunoscute în cazul unei noi înmatriculări.

Capitolul 3
Dispoziții finale și tranzitorii

Art. 3.1. Sarcina punerii în aplicare a prezentului Regulament revine Comisiei de echivalare a studiilor, susținută logistic de Compartimentul SCOSAAR, persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul institutului organizator de doctorate. Comisia de echivalare va fi numită de Consiliul Științific la solicitarea Președintelui SCOSAAR. Regulamentul și Procedura aferentă vor fi transmise institutelor organizatoare de doctorat și vor fi publicate pe site-ul SCOSAAR și IOD. Comisia de echivalare a studiilor va urmări aplicarea corectă a *„Procedurii de solicitare și aprobare a transferului rezultatelor formative între programe de studii"* de către compartimentele implicate.
Anual se va stabili „calendarul" privind solicitările de transfer prin afișare și publicare pe site-ul SCOSAAR și IOD.
Art. 3.2. Pentru a promova transferabilitatea creditelor între SCOSAAR și celelalte instituții de învățământ superior românești acreditate ce organizează studii universitare de dotorat, Comisia de echivalare va face o analiză comparativă a disciplinelor studiate și a finalităților formative conferite și va propune o „matrice" de transferabilitate între aceste programe, pe care o va supune aprobării Consiliului Științific.
Art. 3.3. Eventualele modificări/actualizări ulterioare ale Regulamentului se aprobă de către Prezidiul Academiei Române.

Procedura de solicitare și aprobare a transferului rezultatelor între programe de studii

1. Studenții care doresc transferul la programe de studii oferite de SCOSAAR și/sau transferul de credite acumulateîn cadrul unor programe de studii din afara SCOSAAR, vor depune un dosar de solicitare a transferului cu conținutul descris mai jos.

Dosarele se depun în prima jumătate a lunii **septembrie** la institutul organizator de doctorate, în perioada fixată prin „calendarul" întocmit și publicat anual. Institutul organizator de doctorate (IOD) și Compartimentul SCOSAAR va afișa pe site „Procedura de solicitare a transferului".

Depășirea termenului de depunere a dosarelor, precum și dosarele găsite incomplete la termenul limită, determină amânarea deciziei privind transferul pentru următorul an universitar.

2. Dosarele solicitanților vor cuprinde:

2.1. În cazul studenților-doctoranzi din cadrul SCOSAAR care solicită recunoașterea creditelor obținute anterior în alte programe de studii decât cel urmat în momentul solicitării:

a) cerere, cu precizarea disciplinelor între care se solicită echivalarea și a programelor de studii din careacestea fac parte;

b) dovadă privind notele și numărul de credite obținute la disciplinele promovate pentru care se solicităechivalarea;

c) descrierea sumară a disciplinei/disciplinelor promovate, conform OMEC nr. 3617/2005 privindaplicarea generalizată a Sistemului European de Credite Transferabile, practica universitară internațională și metodologia ECTS (nu este necesară pentru discipline promovate în cadrul SCOSAAR);aceasta va evidenția:

- finalitățile formative (*learning outcomes*)
- principalele capitole/teme studiate
- numărul de ore-contact
- procedura de evaluare
- numărul de credite acumulate prin promovare.

2.2. În cazul studenților-doctoranzi ai SCOSAAR care solicită *recunoașterea creditelor* acumulate în cadrul unor perioade de studii efectuate în străinătate:

a) cerere, cu acordul de principiu al Directorului de Departament și Președintelui SCOSAAR care organizează programul de studii către care sesolicită transferul creditelor;

b) notele și numărul de credite obținute la disciplinele promovate ;

c) planul de învățământ aferent programului de studii frecventat, cuprinzând disciplinele, numărul de ore-contact și numărul de credite alocate fiecărei discipline (credite ECTS sau alte tipuri de credite formative, caz în care se va preciza modul de alocare); în cazul altor sisteme de notare se vor indicași gradațiile ECTS corespunzătoare notelor;

d) descrierea sumară a fiecărei discipline promovate, în conformitate cu practica universitară internațională și metodologia ECTS; aceasta va evidenția:

- finalitățile formative (*learning outcomes*)
- principalele capitole/teme studiate
- numărul de ore-contact
- procedura de evaluare
- numărul de credite acumulate prin promovare

2.3. În cazul studenților înscriși la alte instituții de învățământ superior acreditate, românești și străine, care solicită *transferul* la programe de studii din cadrul SCOSAAR:

a) cerere, cu acordul de principiu al Directorului de Departament și Președintelui SCOSAAR care organizează programele de studii între careintervine transferul;

b) notele și numărul de credite obținute la disciplinele promovate;

c) planul de învățământ aferent programului de studii frecventat, cuprinzând disciplinele, numărul de ore-contact și numărul de credite alocate fiecărei discipline (credite ECTS sau alte tipuri de credite formative, caz în care se va preciza modul de alocare); în cazul altor sisteme de notare se vor indicași gradațiile ECTS corespunzătoare notelor;

d) descrierea sumară a fiecărei discipline promovate, conform OMEC nr. 3617/2005 privind aplicarea generalizată a Sistemului European de Credite Transferabile, practica universitară internațională șimetodologia ECTS; aceasta va evidenția:

- finalitățile formative (*learning outcomes*)
- principalele capitole/teme studiate
- numărul de ore-contact
- procedura de evaluare
- numărul de credite acumulate prin promovare

3. Persoana responsabilă din cadrul institutului organizator de doctorate va verifica conținutul dosarelor depuse în raport cu prevederile prezentei și va transmite Compartimentului SCOSAAR pentru a înainta dosarul Comisiei de echivalări numai dosarele complete.

4. Comisia de echivalare analizează documentele din dosarele solicitanților din perspectiva prevederilor „Regulamentului privind transferul rezultatelor formative între programe de studii".

Unde este cazul, Comisia poate cere solicitanților să furnizeze informații și documente suplimentare.

5. Pe baza analizei dosarelor, Comisia întocmește fișe de echivalare și un referat defalcat corespunzător programelor de studii pentru care există solicitări de transfer. Pentru fiecare solicitant și program de studii vizat, în concordanță cu prevederile „Regulamentului privind transferul rezultatelor formative între programe de studii" referatul cuprinde propuneri/recomandări privind:

- disciplinele, numărul de credite echivalabile și notele aferente;
- posibilitatea/imposibilitatea aprobării transferului;
- disciplinele și numărul de credite-diferență în sarcina studentului-doctorand;
- posibilitățile de recuperare a creditelor-diferență (eșalonare în timp).

Referatul Comisiei este înaintat conducătorului de doctorat și Directorului de Departament.

6. Pe baza Raportului Comisiei și a rezultatelor selecției (unde este cazul), se propune aprobarea/neaprobarea solicitărilor de transfer al rezultatelor formative acumulate. Raportul Comisiei, cu aprobarea Directorului de Departament este transmisă Președintelui SCOSAAR spre aprobare.

7. Pe baza Raportului Comisiei și aprobării Directorului de Departament și Președintelui SCOSAAR, se vor emit *deciziile de înmatriculare* a studenților-doctoranzi transferați. Compartimentul SCOSAAR transmite deciziile către persoana responsabilă din cadrul

institutelor de doctorat și către studenții solicitanți în cel mai scurt timp posibil și nu mai târziu de **15 noiembrie**.

Decizia de înmatriculare va fi însoțită de „fișa de echivalare”, elaborată de Comisia de echivalări, care va cuprinde:

- disciplinele echivalate (din programul de studii frecventat anterior), notele aferente și numărul decredite;
- disciplinele ce constituie diferențe, urmând a fi promovate de student în paralel cu studiile curente;
- condițiile în care trebuie recuperate diferențele (intervalul de timp maxim admis).

8. Pentru studenții transferați la SCOSAAR de la alte universități, frecventarea disciplinelor stabilite ca diferențe și susținerea evaluărilor aferente se face pe perioada unui singur an universitar (pentru primele două sesiuni de evaluare succesive).

9. Calendarul procedurii de solicitare și aprobare a transferurilor se actualizează anual și se publică pe site-ul SCOSAAR și IOD pentru transferurile ce vizează următorul an universitar. Împreună cu „calendarul” se va publica și conținutul dosarelor de solicitare a transferului.

10. După necesități, se va putea modifica/actualiza Procedura cu aprobarea Consiliului Științific și a Președintelui SCOSAAR..

METODOLOGIA PRIVIND ACORDAREA ȘI REVOCAREA CALITĂȚII DE CONDUĂTOR DE DOCTORAT ÎN CADRUL SCOSAAR

METODOLOGIA PRIVIND ACORDAREA ŞI REVOCAREA CALITĂȚII DE CONDUĂTOR DE DOCTORAT ÎN CADRUL SCOSAAR

I. Dispoziții generale

Prezenta metodologie a fost elaborată în acord cu prevederile următoarelor acte normative:

- ***Legea educației naționale nr. 1/2011, cu modificările şi completările ulterioare;***
- ***Hotărârea Guvernului nr. 681/2011 privind aprobarea Codului studiilor universitare de doctorat, cu modificările şi completările ulterioare;***
- ***Ordinul nr. 5229/2020 din 17 august 2020 pentru aprobarea metodologiilor referitoare la acordarea atestatului de abilitare, acordarea titlului de doctor, precum şi la soluţionarea sesizărilor cu privire la nerespectarea standardelor de calitate sau de etică profesională, inclusiv cu privire la existenţa plagiatului, în cadrul unei teze de doctorat;***
- ***Regulamentul SCOSAAR privind susţinerea publică a tezelor de abilitare;***
- ***Ordinul nr. 5382/2016 din 29 septembrie 2016 privind funcţionarea şcolilor doctorale în anul universitar 2016 - 2017;***
- ***Ordinul nr. 4210/2018 din 31 iulie 2018 privind înfiinţarea domeniilor de doctorat în cadrul Academiei Române.***

Institutele de cercetare ale Academiei Române care au calitatea de a organiza susținerea tezelor de abilitare sunt:

1. Institutul de Statistică Matematică şi Matematică Aplicată"Gheorghe Mihoc-Caius Iacob"
2. Institutul de Matematică "Simion Stoilow"
3. Institutul Astronomic
4. Institutul de Chimie Fizică „Ilie Murgulescu"
5. Centrul de Chimie Organică "Costin D. Nenițescu"
6. Institutul de Geografie
7. Institutul de Geodinamică "Sabba S. Ștefănescu"
8. Institutul de Biologie şi Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"
9. Institutul de Biochimie
10. Institutul de Biologie

11. Institutul de Virusologie “Ștefan S. Nicolau”
12. Institutul Antropologice "Francisc I. Rainer"
13. Institutul de Speologie ”Emil Racoviţă”
14. Institutul de Lingvistică ”Iorgu Iordan - Al. Rosetti”
15. Institutul de Istorie și Teorie Literară "George Călinescu”
16. Institutul de Arheologie "Vasile Pârvan"
17. Institutul de Istorie "Nicolae Iorga"
18. Institutul de Filosofie si Psihologie ”Constantin Rădulescu Motru”
19. Institutul de Etnografie şi Folclor ”Constantin Brăiloiu”
20. Institutul de Studii Sud Est Europene
21. Institutul Național de Cercetări Economice ”Costin C. Kirițescu”
22. Institutul de Cercetare a Calității Vieții
23. Institutul de Cercetări Juridice „Acad. Andrei Rădulescu”
24. Institutul de Mecanica Solidelor
25. Institutul de Cercetări pentru Inteligență Artificială ”Mihai Drăgănescu”
26. Institutul de Istorie "G. Bariţiu" Cluj-Napoca
27. Institutul de Lingvistică și Istorie Literară “Sextil Pușcariu” Cluj Napoca
28. Institutul de Chimie Macromoleculară ”Petru Poni” Iași
29. Institutul de Istorie "A. D. Xenopol"
30. Institutul de Arheologie Iaşi
31. Institutul de Informatică Teoretică Iași
32. Institutul de Chimie Timișoara ”Coriolan Drăgulescu"

Metodologia stabilește modul în care se realizează acordarea și revocarea calității de conducător de doctorat al Școlii de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR) – Academia Română.

Organizarea procesului privind acordarea sau revocarea calității de conducător de doctorat al Școlii de Studii Avansate a Academiei Române se desfășoară în conformitate cu prevederile legislației naționale și a prezentei metodologii.

Prezenta metodologie se aplică cadrelor didactice/cercetătorilor, conducători de doctorat, titulari sau afiliați care au obținut calitatea de conducător de doctorat :

- care doresc să se afilieze la IOSUD - Școala de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR);
- cărora li se revocă calitatea de conducător de doctorat al Școlii de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR)

II. Organizarea și desfășurarea procesului de afiliere

Cadrele didactice/cercetătorii titulari, conducători de doctorat care au obținut atestatul de abilitare pot solicita să se afilieze Școlii de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR).

Solicitantul va depune la Registratura Academiei Române pentru Compartimentul SCOSAAR și Studii Postdoctorale dosarul de afiliere.

Dosarul de afiliere va conține următoarele documente:

a) Adresă de înaintare ce va cuprinde și opis-ul documentelor cu specificația: document în original/document în copie, conform cerințelor prezentei metodologii;

b) Dovada deţinerii calităţii de conducător de doctorat (copia după Ordinul de Ministru privind acordarea atestatului de abilitare sau a calității de conducător de doctorat);

c) Documente personale de identificare, în copie simplă: actul de identitate, dovada schimbării numelui în cazul în care numele înscris pe OM nu mai coincide cu cel din actul de identitate;

d) Cererea privind acceptarea calității de conducător de doctorat abilitat în cadrul institutului organizator de doctorat (IOD) (Anexa 1 în original);

e) Documente care să dovedească îndeplinirea standardelor minimale de performanță științifică, calculate și justificate conform standardelor minimale CNATDCU specifice domeniului și în vigoare la data cererii de afiliere (fișa de îndeplinire a standardelor minimale conform cerințelor CNATDCU). Aceste documente trebuie să fie semnate în original de cadidat pe fiecare pagină și să fie însoțite declarația pe proprie răspundere privind îndeplinirea standardelor minimale CNATDCU specifice domeniului și în vigoare la data cererii de afiliere (Anexa 2 în original)

f) Acordul scris al institutului unde acesta solicită să fie conducător de doctorat (Anexa 3 în original) însoțit de raportul de verificare al candidatului (Anexa 4 în original);

g) Listă de teme de cercetare interdisciplinare, în cazul în care şcoala doctorală îşi asumă o tematică interdisciplinară, semnată de către solicitant în original pe fiecare pagină;

h) În cazul în care solicitantul este deja conducător de doctorat la o altă școală doctorală, este necesar acordul de transfer de la instituția în cauză la SCOSAAR;

i) Curriculum vitae (în format Europass), semnat în original pe fiecare pagină;

j) Lista de lucrări științifice semnată în original pe fiecare pagină;

k) Apartenența printr-o poziție permanentă la un institut al Academiei Române sau într-o unitate de învățământ superior;

l) Pentru persoanele care au obținut calitatea de conducător de doctorat în străinătate este necesară recunoașterea calității de conducător de doctorat conform legislației în vigoare;

m) Cererea-tip, semnată de către candidat, pentru afilierea la SCOSAAR (Anexa 5 și Anexa 6 în original);

n) Trei recomandări de la membrii Academiei Române, semnate în original

Documentele se depun într-un dosar, atât pe suport de hârtie cât și în format electronic (scanat/pdf pe un stick). Fiecare document va fi scanat separat.

Compartimentul SCOSAAR va înainta dosarul spre aprobare Secției Științifice, Directorului de Departament și Președintelui SCOSAAR (Anexa 5 și Anexa 6).

Consiliul SCOSAAR analizează cererea candidatului, iar în cazul unei decizii favorabile, înaintează dosarul către Prezidiul Academiei Române în vederea validării (Anexa 7).

În cazul în care dosarul de afiliere este acceptat/respins, candidatul este înștiințat printr-o adresă oficială (Anexa 8).

III. Organizarea și desfășurarea procesului de retragere / revocare a calității de conducător de doctorat al Școlii de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR)

Conducătorul de doctorat afiliat Școlii de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR) poate cere retragerea calității de membru al școlii doctorale (dezafilierea) (Anexa 9). Cererea este adusă la cunoștință Consiliului Școlii Doctorale și supusă aprobării Prezidiului Academiei Române.

Consiliul SCOSAAR analizează cererea candidatului, și o înaintează spre aprobare Prezidiului Academiei Române (Anexa 10).

În cazul în care există conducători de doctorat care nu trimit autoevaluarea performanțelor lor, la termenele stabilite, conform cerințelor solicitate de către Școala de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR), în vederea întocmirii Raportului de autoevaluare a școlii doctorale, pentru aceştia se demarează automat procesul de revocare a calitatății de conducător de doctorat. Decizia de revocare a calității de conducător de doctorat al școlii doctorale este luată de Consiliul Științific și trimisă spre aprobare Prezidiului Academiei Române.

METODOLOGIE PRVIND SITUAȚIILE DE PRELUNGIRE SAU ÎNCETARE A CALITĂȚII DE STUDENT-DOCTORAND

METODOLOGIE PRVIND SITUAȚIILE DE PRELUNGIRE SAU ÎNCETARE A CALITĂȚII DE STUDENT-DOCTORAND

I DISPOZIȚII GENERALE

Prezenta metodologie a fost elaborată în acord cu prevederile următoarelor acte normative:

- **Legea educației naționale nr. 1/2011, cu modificările şi completările ulterioare;**
- **Hotărârea Guvernului nr. 681/2011 privind aprobarea Codului studiilor universitare de doctorat, cu modificările şi completările ulterioare;**
- **Legea nr. 288/2004 privind organizarea studiilor universitare ;**
- **Legea nr. 49/2013 pentru modificarea art. 12 din Legea nr. 288/2004 privind organizarea studiilor universitare;**
- **OUG nr. 95/2018 privnd reforma în domeniul sănătății, cu modificările și completările ulterioare.**

I. Întreruperea studiilor doctorale

a) Întreruperea studiilor universitare de doctorat se face la solicitarea studentului-doctorand cu acordul conducătorului de doctorat, avizul Departamentului şi se aprobă de către Preşedintele SCOSAAR. Perioadele de întrerupere cumulate a studiilor universitare de doctorat nu pot depăşi 2 ani.

b) Studiile universitare de doctorat se pot întrerupe pe motive temeinice, neimputabile studentului-doctorand, astfel:

- concedii medicale (motivate de accidente cu vătămări corporale grave atestate de către medici specialişti, contactarea unor boli grave/cronice care necesită tratament de lungă durată);
- concediile maternale (în cazul sarcinii, lăuziei, concediu postnatal, concediu pentru creștere și îngrijire copil);
- situaţiile de forţă majoră.

c) Durata studiilor universitare de doctorat se prelungeşte, în caz de întrerupere, corespunzător cu perioadele cumulate ale întreruperilor aprobate.

d) Prin forţă majoră se înţelege acel eveniment imprevizibil, insurmontabil şi imposibil de înlăturat, independent de voinţa părţilor, intervenit pe durata derulării contractului, şi care împiedică executarea integrală sau în parte a contractului şi care exonerează de răspundere partea care o invocă. Partea care invocă forţa majoră are obligaţia de a notifica celorlalte părţi cazul de forţă majoră în termen de 5 (cinci)

zile de la data apariţiei şi de a dovedi existenţa situaţiei de forţă majoră în termen de 15 (cincisprezece) zile în baza unor certificate eliberate de autorităţile competente.

e) Durata totală a întreruperilor aprobate pentru un doctorand nu poate depăși 2 ani (24 de luni)
f) Studiile universitare de doctorat se pot întrerupe din motive temeinice, în condiţiile stabilite prin regulamentul şcolii doctorale. Durata acestor studii se prelungeşte cu perioadele cumulate ale întreruperilor aprobate.
g) Întreruperea se face doar pe durata programului doctoral pe durata ciclului de studii universitare de doctorat de 3 ani, respectiv 4 ani (pentru domeniul Medicina și Medicină Veterinară) și nu în timpul perioadelor de prelungire, de grație sau de amânare a susținerii.
h) Studentul-doctorand depune la institutul organizator de doctorat (I.O.D.) cererea de întrerupere (**Anexa nr. 1**) însoțită de actele doveditoare conform contractului de studii universitare de doctorat. Cererea completată și semnată de doctorand va fi avizată de conducătorul de doctorat și aprobată de directorul de departament.
i) Cererea însoțită de actele doveditoare, va fi verificată de persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul I.O.D. al Academiei Române. După verificare, cererea cu documentele justificative va primi număr de ieșire de la registratura institutului, apoi va fi depusă la Registratura Academiei Române de către persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul IOD pentru Compartimentul Şcolii de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR). Aceasta va fi înaintată Președintelui SCOSAAR pentru aprobare, împreună cu specificațiile privind situația academică și financiară ale studentului-doctorand.
j) Pentru fiecare întrerupere se încheie câte un act adițional la contractul de studii universitare de doctorat (**Anexa nr. 2**).
k) După finalizarea perioadei de întrerupere solicitată, studentul-doctorand va întocmi o cerere de revenire în activitatea doctorală (**Anexa nr. 3**). Cererea, vizată de conducătorul de doctorat și aprobată de directorul de department va fi înregistrată la institutul de cercetare, apoi persoana responsabilă de doctorate din cadrul institutului o va depune la sediul Academiei Române.

II. Prelungirea studiilor doctorale

a) În situaţii speciale, studentul-doctorand poate solicita prelungirea duratei programului de doctorat cu 1-2 ani, cu aprobarea SCOSAAR, la propunerea conducătorului de doctorat. Situaţiile pentru care poate fi prelungit programul de pregătire sunt:

- identificarea, în timpul studiilor, a unor direcţii de cercetare legate de tema tezei, care nu au fost intuite la momentul elaborării programului de pregătire şi care presupun o aprofundare specială;

- alte situaţii justificate care impun prelungirea, acceptate de conducătorul de doctorat;
- cazurile determinate de forţa majoră.

b) Prin forţă majoră se înţelege acel eveniment imprevizibil, insurmontabil şi imposibil de înlăturat, independent de voinţa părţilor, intervenit pe durata derulării contractului, şi care împiedică executarea integrală sau în parte a contractului şi care exonerează de răspundere partea care o invocă. Partea care invocă forţa majoră are obligaţia de a notifica celorlalte părţi cazul de forţă majoră în termen de 5 (cinci) zile de la data apariţiei şi de a dovedi existenţa situaţiei de forţă majoră în termen de 15 (cincisprezece) zile în baza unor certificate eliberate de autorităţile competente.
c) Pentru perioada de prelungire a studiilor doctorale se încheie un act aditional (**Anexa nr. 2**) la contractul de studii doctorale. Durata totală a prelungirilor aprobate pentru un doctorand nu poate depăși 2 ani (24 de luni), fără alte fracțiuni.
d) Doctoranzii aflați în prelungire sunt incluși în numărul maxim de doctoranzi îndrumați de un conducător de doctorat. Prelungirea se acordă pentru finalizarea tezei de doctorat **numai după îndeplinirea obligaţiilor** din contractul de studii universitare de doctorat și din planul studiilor universitare de doctorat.
e) Pe toată durata prelungirilor aprobate nu se pot acorda întreruperi ale studiilor doctorale.
f) Pe perioada de prelungire studenților-doctoranzi nu li se acordă stipendiu.
g) Studentul-doctorand după îndeplinirea obligațiilor contractuale și din planul studiilor universitare de doctorat depune în luna septembrie, la institutul organizator de doctorat (I.O.D.), cererea de prelungire (**Anexa nr. 4**). Cererea avizată de conducătorul de doctorat și aprobată de directorul de department, însoțită de copia planului de studii universitare de doctorat și de actul aditional (**Anexa nr. 2**) va fi verificată de persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul institutului organizator de doctorat al Academiei Române. După verificare va primi un număr de ieșire de la registratura institutului. Cererea va fi înregistrată la Registratura Academiei Române de către persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul IOD până la data de 10 octombrie și va fi depusă la Compartimentul Şcolii de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR). Aceasta va fi înaintată Președintelui SCOSAAR pentru aprobare.
h) Studentul-doctorand care nu a solicitat prelungirea studiilor universitare de doctorat și nu și-a susținut teza la împlinirea termenului legal de 3 respectiv 4 ani va fi exmatriculat.
i) Prelungirea se face numai după terminarea ciclului de studii universitare de doctorat de 3 ani, respectiv 4 ani (pentru domeniul Medicina și Medicină Veterinară) și nu în timpul ciclului de studii universitare de doctorat.

III. Perioada de grație

a) Perioada de grație se acordă în conformitate cu art. 40 din H.G. nr. 681/2011cu modificările și completările ulterioare, pentru maximum 2 ani (24 de luni), numai doctoranzilor care au finalizat programul doctoral (cuprinzând perioada normală de 3 sau 4 ani și eventualele perioade de întrerupere și/sau prelungire), dar nu au reușit să finalizeze și să depună oficial teza de doctorat. Pentru perioada de grație se încheie un act adițional (**Anexa nr. 2**) la contractul de studii doctorale.
b) Perioada de grație va fi acordată doar doctoranzilor pentru care conducătorulde doctorat certifică faptul că au redactat cel puțin 50% din teza de doctorat.
c) Susținerea publică a tezei de doctorat trebuie să se încadreze în interiorul perioadei de grație, art. 40 din H.G. nr. 681/2011 cu modificările și completările ulterioare: „studentul doctorand mai are la dispoziție o perioadă de grație de maximum 2 ani pentru a finaliza și susține public teza, depășirea acestui termen conducând în mod automat la exmatricularea sa".
d) Pe toată durata perioadei de grație nu se pot acorda întreruperi ale studiilor doctorale.
e) Pe perioada de grație studenților-doctoranzi nu li se acordă stipendiu.
f) Studentul-doctorand depune în luna septembrie, la institutul organizator de doctorat (I.O.D.), cererea de grație (**Anexa nr. 5**), avizată de conducătorul de doctorat și aprobată de directorul de department însoțită de referatul conducătorului de doctorat prin care acesta certifică faptul că doctorandul a redactat cel puțin 50% din teza de doctorat.
g) Cererea însoțită de referatul conducătorului de doctorat și de actul aditional (**Anexa nr. 2**) va fi verificată de persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul institutului organizator de doctorat al Academiei Române. După verificare va primi număr de ieșire de la registratura institutului. Cererea va fi înregistrată la Registratura Academiei Române de către persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul institutului de cercetare până la data de 31 octombrie și va fi depusă la Compartimentul Şcolii de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR). Cererea va fi înaintată Președintelui SCOSAAR pentru aprobare
h) Cererea de grație se face pe o perioadă de 1 sau 2 ani, fără alte fracțiuni
i) Studentul doctorand care nu a solicitat o perioadă de grație va fi exmatriculat.

IV. Amânarea susținerii tezei conform legii 49/2013

a) În situații speciale, când tematica abordată necesită o perioadă mai mare de studiu sau experimentare, la propunerea conducătorului de doctorat și cu avizul directorului de departament, se poate acorda amânarea susținerii publice pentru „maximum 4 ani de la terminarea studiilor universitare de doctorat". Pentru

amânarea susținerii tezei de doctorat se încheie un act adițional la contractul de studii universitare de doctorat. Această lege trebuie corelată cu Legea 1/2011 cu modificările și completările ulterioare și cu H. G. Nr. 681/2011 cu modificările și completările ulterioare, fapt pentru care conducătorii de doctorat trebuie să facă un referat cu propuneri temeinic motivate. Amânarea se acordă doar în situații cu adevărat „speciale", și atunci când există convingerea fermă că la finele perioadei de amânare teza va fi finalizată și susținută cu succes.

j) Amânarea susținerii tezei conform legii 49/2013 se acordă **numai după îndeplinirea obligaţiilor** din contractul de studii universitare de doctorat și din planul individual de doctorat (susținerea cu succes a tuturor rapoartelor și proiectelor de cercetare, precum și a celorlalte activități prevăzute în planul individual), doctoranzilor pentru care conducătorul de doctorat certifică faptul că au redactat cel puțin 80% din teza de doctorat.

b) Pe toată durata de amânare a susținerii tezei de doctorat nu se pot acorda întreruperi ale studiilor doctorale, iar studenților-doctoranzi nu li se acordă stipendiu.

c) Studentul-doctorand depune în luna septembrie, la institutul organizator de doctorat (I.O.D.), cererea de amânare a susținerii tezei de doctorat (**Anexa nr. 6**), avizată de conducătorul de doctorat și aprobată de directorul de department însoțită de referatul conducătorului de doctorat și copia planului de studii universitare de doctorat.

d) Cererea însoțită de referatul conducătorului de doctorat, de copia planului de studii universitare de doctorat și de actul adițional (**Anexa nr. 2**) va fi verificată de persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul institutului organizator de doctorat al Academiei Române. După verificare, cererea va primi număr de ieșire de la registratura institutului. Cererea va fi înregistrată la Registratura Academiei Române de către persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul IOD până la data de 10 octombrie și va fi depusă la Compartimentul Şcolii de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR). Cererea va fi înaintată Președintelui SCOSAAR pentru aprobare.

V. Încetarea calității de student-doctorand

a) Calitatea de student-doctorand încetează la acordarea titlului de doctor (deci, nu la data susținerii publice a tezei) sau prin exmatriculare.

b) Studenţii pot fi exmatriculaţi sau pot renunţa ei înşişi la calitatea de student-doctorand.

c) În prima situaţie, se exmatriculează studenţii-doctoranzi care:
   - nu au promovat anul de studii;
   - au încălcat Codul de etică şi deontologie universitară;
   - au încercat să promoveze examenele prin fraudă.

d) Propunerea de exmatriculare (**Anexa nr.7**) este întocmită de conducătorul de doctorat pe baza unui referat și aprobată de directorul de departament.

e) Cererea va fi verificată de persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul institutului organizator de doctorat al Academiei Române. După verificare cererea va primi număr de ieșire de la registratura institutului. Cererea va fi înregistrată la Registratura Academiei Române de către persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul institutului de cercetare și va fi depusă la Compartimentul Şcolii de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR). Cererea va fi înaintată Președintelui SCOSAAR pentru aprobare.

f) Decizia de exmatriculare se aprobă de către Consiliul Științific și Președintele SCOSAAR, iar după primirea sa se va opera exmatricularea, atât în evidenţele proprii cât şi în aplicaţia informatică.

g) Studentul-doctorand care încearcă să promoveze disciplinele prin fraudă va fi exmatriculat pe baza procesului verbal întocmit de comisia de examinare care participă la examenul respectiv.

h) Studentul-doctorand care nu a solicitat extinderea duratei activității de doctorat printr-o perioada de prelungire/ perioadă de grație / amânarea susținerii tezei de doctorat până la finele anului universitar și nu și-a susținut teza la împlinirea termenului legal de 3 ani respective 4 ani va fi exmatriculat la propunerea conducătorului de doctorat (**Anexa nr. 7).**

i) În cazul în care un student-doctorand doreşte să se retragă de la studii, din diverse motive, poate solicita aceasta prin depunerea unei cereri (**Anexa nr. 8**), avizată de conducătorul de doctorat, aprobată de directorul de department. Studentul-doctorand depune la institutul organizator de doctorat (I.O.D.) cererea de retragere.

j) Cererea de retragere va fi verificată de persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul institutului organizator de doctorat al Academiei Române. După verificare cererea va primi un număr de ieșire de la registratura institutului. Cererea va fi înregistrată la Registratura Academiei Române de către persoana responsabilă cu doctoratele din cadrul institutului de cercetare și va fi depusă la Compartimentul Şcolii de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR). Cererea va fi înaintată Președintelui SCOSAAR pentru aprobare

k) Cererea de retragere se depune la începutul fiecărui semestru conform art.17 din Contractul de studii universitare de doctorat.

METODOLOGIA ORGANIZĂRII ȘI DESFĂȘURĂRII CONCURSULUI DE ADMITERE LA STUDIILE UNIVERSITARE DE DOCTORAT

Metodologia organizării și desfășurării concursului de admitere la studiile universitare de doctorat

I. Norme de organizare

Concursul de admitere pentru toate domeniile de doctorat din cadrul fiecărui institut/centru al Academiei Române, se desfășoară conform legislației în vigoare:

- ***Legea Educației naționale nr. 1/2011, cu modificările și completările ulterioare;***
- ***Hotărârea Guvernului nr. 681/2011 privind aprobarea Codului studiilor universitare de doctorat;***
- ***Legea nr. 288/2004 privind organizarea studiilor universitare, cu modificările și completările ulterioare;***
- ***Ordinul ministrului educației Nr. 6102/15.12.2016, cu modificările și completările ulterioare, pentru aprobarea Metodologiei-cadru privind organizarea admiterii în ciclurile de studii universitare de licență, de master și de doctorat;***
- ***Ordinul ministrului educației nr. 3199/2021;***
- ***Legea nr. 288/2004 privind organizarea studiilor universitare, cu modificările și completările ulterioare.***

Institutele de cercetare ale Academiei Române abilitate să organizeze studii universitare de doctorat sunt:

1. Institutul de Statistică Matematică și Matematică Aplicată „Gheorghe Mihoc - Caius Iacob”;
2. Institutul de Matematică „Simion Stoilow”;
3. Institutul Astronomic;
4. Institutul de Chimie Fizică „Ilie Murgulescu”;

5. Centrul de Chimie Organică „Costin D. Nenițescu”;
6. Institutul de Geografie;
7. Institutul de Geodinamică „Sabba S. Ștefănescu”;
8. Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”;
9. Institutul de Biochimie;
10. Institutul de Biologie;
11. Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau”;
12. Institutul de Antropologie „Francisc I. Rainer”;
13. Institutul de Speologie „Emil Racoviță”;
14. Institutul de Lingvistică „Iorgu Iordan - Al. Rosetti”;
15. Institutul de Istorie și Teorie Literară „George Călinescu”;
16. Institutul de Arheologie „Vasile Pârvan”;
17. Institutul de Istorie „Nicolae Iorga”;
18. Institutul de Filosofie și Psihologie „Constantin Rădulescu Motru”;
19. Institutul de Etnografie și Folclor „Constantin Brăiloiu”;
20. Institutul de Studii Sud Est Europene;
21. Institutul Național de Cercetări Economice „Costin C. Kirițescu”;
22. Institutul de Cercetare a Calității Vieții;
23. Institutul de Cercetări Juridice „Acad. Andrei Rădulescu”;
24. Institutul de Mecanica Solidelor;
25. Institutul de Cercetări pentru Inteligență Artificială „Mihai Drăgănescu”;
26. Institutul de Istorie „George Barițiu” Cluj-Napoca;
27. Institutul de Lingvistică și Istorie Literară „Sextil Pușcariu” Cluj-Napoca;
28. Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași;
29. Institutul de Istorie „A. D. Xenopol”;

30. Institutul de Arheologie Iași;
31. Institutul de Informatică Teoretică Iași;
32. Institutul de Chimie „Coriolan Drăgulescu” Timișoara.

Admiterea la studiile universitare de doctorat se face prin concurs în funcție de domeniul de doctorat vizat, în sesiunea **septembrie-octombrie**.

Concursul de admitere la doctorat se organizează de către institutele de cercetare mai sus menționate, prin precizarea informațiilor relevante pe paginile web și la sediul acestora.

II. Calendarul admiterii

Înscrierile și concursul de admitere la studiile universitare de doctorat se desfășoară conform calendarului concursului de admitere.

III. Pregătirea desfășurării concursului de admitere

În urma consultării conducătorilor de doctorat, SCOSAAR și institutele de cercetare ale Academiei Române, organizatoare de doctorat, afișează pe pagina web tematicile, bibliografia și numărul de locuri aferente colocviului de admitere.

Pentru desfășurarea în bune condiții a admiterii la doctorat se vor avea în vedere următoarele:

- Forma de desfășurare a concursului de admitere, inclusiv structura probelor din cadrul acestuia și organizarea unei sau mai multor comisii sau subcomisii de admitere;
- Tematica concursului de admitere și bibliografia comună, unde este cazul;
- Criteriile de evaluare și minimum 2 (două) criterii de departajare a candidaților;
- Pentru institutele de cercetare care organizează admiterea cu ajutorul mai multor comisii sau subcomisii se va prevedea explicit modul în care se va

realiza clasificarea tuturor candidaților dintr-un domeniu de doctorat pe o listă unică, în ordinea descrescătoare a mediilor generale obținute de candidați, pentru alocarea locurilor cu stipendiu;

- Modul de soluționare a contestațiilor la probele scrise.

Institutele vor desemna comisiile de admitere și, după caz, comisiile de soluționare a contestațiilor.

IV. Condiții generale de înscriere la concurs

La colocviul de admitere la doctorat se pot prezenta candidații care dețin:

a) Diploma de licență sau echivalentă a studiilor universitare de lungă durată organizate conform Legii nr. 84/1995 republicată, cu modificările și completările ulterioare; titularii diplomelor de studii de lungă durată au dreptul să se înscrie la studii universitare de doctorat fără obligativitatea de a mai parcurge ciclul II de studii universitare de master;
b) Diploma de masterat pentru ciclului de studii universitare de masterat organizate conform Legii nr. 288/2004, cu modificările și completările ulterioare;
c) Absolvenții studiilor efectuate în străinătate și recunoscute de către direcțiile de specialitate din cadrul Ministerului Educației, ca fiind studii universitare de licență, masterat.

Înscrierile se pot face doar la institutele de cercetare ale Academiei Române, organizatoare de doctorat.

Pentru înscrierea la colocviul de admitere la doctorat, candidații vor prezenta următoarele documente:

- cerere de înscriere – formular tip (Anexa 1);
- certificat de naștere (copie xerox);
- certificat de căsătorie sau alt act de schimbare a numelui (copie xerox);

- diplomă de bacalaureat (copie legalizată);
- diplomă de licență și foaie matricolă (copii legalizate);
- diplomă de master și foaie matricolă (copii legalizate);
- cartea de identitate (copie xerox);
- atestat de susținere a unui examen de competență lingvistică (nivelul minim B2, conform cadrului de referință al Consiliului Europei);
- alte certificate care atestă pregătirea universitară și/sau postuniversitară în domeniu (copii legalizate);
- curriculum vitae – model european (Partea I: CV, Partea a II-a: descrierea activității științifice);
- lista lucrărilor științifice publicate în domeniul de studiu ales, dacă este cazul;
- lista bibliografică cu literatura de specialitate studiată pentru colocviul de admitere;
- fișa de înscriere – formular tip (Anexa 2);
- propunerea privind teza de doctorat ce urmează a fi elaborată și o scurtă prezentare a acesteia – 1, 2 pagini – formular tip (Anexa 3);
- adeverință de salariat în cazul în care candidatul este angajat.

Absolvenții de studii universitare de masterat, promoția anului în curs, pot depune la dosar adeverința de absolvire a studiilor universitare de masterat.

Candidații care au efectuat studiile în străinătate au obligația de a prezenta la înscriere traducerea legalizată a diplomei obținute și a atestatului de recunoaștere a acestor studii eliberat de către direcția de specialitate din cadrul Ministerului Educației în conformitate cu O.M.E.N.C.Ș. nr. 6102/2016, art. 55.

Alte detalii cu privire la admiterea la studiile universitare de doctorat pot fi obținute de la institutele organizatoare de doctorat, unde candidații doresc să se înscrie.

SCOSAAR, prin institutele de cercetare, dispune din timp măsuri de informare a candidaților cu privire la tematicile și bibliografiile programelor pentru care se organizează concursul de admitere.

V. Desfășurarea concursului

Concursul de admitere la doctorat se desfășoară în cadrul institutelor de cercetare ale Academiei Române, repartizat pe domenii, în prezența unei comisiei de examinare.

Admiterea la studiile universitare de doctorat reprezintă un proces amplu de selecție a candidaților pentru fiecare poziție vacantă, aprobată de către Prezidiul Academiei Române pentru fiecare conducător de doctorat în parte.

Selecția candidaților pentru accederea la studiile de doctorat este realizată de către comisia de admitere, în limita locurilor vacante aprobate.

Alocarea locurilor cu stipendiu se face cu aprobarea Prezidiul Academiei Române.

VI. Rezultatele concursului

Media minimă de admitere la studiile universitare de doctorat este 8 (opt). Media se calculează cu două zecimale fără rotunjire.

Candidații care își retrag actele de înscriere înainte de afișarea rezultatului final al concursului sunt considerați eliminați din concurs.

Rezultatele concursului de admitere vor fi validate de către Prezidiul Academiei Române și se aduc la cunoștință prin afișare în termen de cel mult 48 de ore.

Candidații declarați admiși sunt înmatriculați la studiile universitare de doctorat în baza rezultatului concursului, prin decizia directorului institutului de cercetare al Academiei Române.

Dosarele candidaților respinși sau ale celor care renunță la școlarizare se restituie candidaților, la cerere, în cel mult 48 de ore, pe baza actelor de identitate, după afișarea rezultatelor finale.

Contestațiile în cazul probelor scrise se depun la secretariatul institutelor în termen de 24 de ore de la afișarea rezultatelor. Institutele de cercetare vor stabili condițiile în care contestațiile pot fi depuse. Conform ***Ordinul ministrului educației Nr. 6102/15.12.2016***, rezultatele obținute la probele orale nu pot fi contestate.

VII. Înmatricularea candidaților declarați admiși

În perioada stabilită, după soluționarea contestațiilor și validarea rezultatelor de către Prezidiul Academiei Române, înmatricularea candidaților declarați admiși se face prin decizia directorului institutului de cercetare.

Candidații admiși completează și semnează contractul de școlarizare. După aprobarea înmatriculării, studenții sunt înscriși în Registrul matricol unic (RMU) cu un număr unic valabil pentru întreaga perioadă de școlarizare la specializarea/specializările/programul/programele de studii la care au fost admiși.

Metodologia se afișează pe pagina web a institutelor de cercetare organizatoare de doctorat din cadrul Academiei Române, cât și pe site-ul SCOSAAR.

Prezenta metodologie a fost aprobată de Prezidiul Academiei Române în data de 07.09.2021.

Anexa 1

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE

DEPARTAMENTUL .....

Aprobat,

Director Departament

CERERE DE INSCRIERE

pentru colocviul de admitere la doctorat

- Sesiunea:
- Domeniul fundamental:
- Domeniul de doctorat:
- Forma pregătirii:
- Conducător științific:_____

CANDIDAT:

Numele și prenumele cu inițiala tatălui…….....

Prenumele părinților: tatăl……....., mama…….....

Domiciliu stabil:

Localitatea…….....Strada.…….....

.....Nr.....Scara.....Bloc.....Apartament.....Sector…...….....

Cod poștal..... E-mail.....…….....Tel.

Domiciliu…….....Fax.....Tel. mobil.....

Naționalitatea……...Data nașterii…….....

Localitatea……..Județul……...

Profesia de bază……..... Locul de muncă……..

Adresa instituției unde lucrează…….....

Telefon…… E-mail.....

Studii superioare absolvite (inclusiv anul absolvirii și durata studiilor):

1……

..……

2……

.....

3.....

.....

Domeniul în care candidatul a obținut licența:

1.....

2.....

3.....

Cursuri de master absolvite (inclusiv anul absolvirii și durata studiilor):

1.....

2.....

Domeniul în care candidatul a obținut specializarea (master):

1.....

2.....

Limbi străine cunoscute (scris, citit, vorbit)…….....

……

Menționez că am susținut testul la limba de circulație internațională .....…….. .....

și am obținut, conform cadrului de referință elaborat de Consiliul Europei, nivelul.....

Starea civilă …….....

Etnie.....

Stare socială specială .....

Situație medicală specială.....

Vă rog să aprobați înscrierea pentru participarea la colocviul de admitere la doctorat sesiunea ....., forma cu frecvență și „cu stipendiu/fără stipendiu”.

Data……

Semnătura…….

Anexa 2

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE

DEPARTAMENTUL .....

FIȘA DE ÎNSCRIERE

1. *Institutul* _____
2. *Domeniul*_____
3. *Forma de pregătire cu frecvență,* „cu stipendiu/fără stipendiu” _____

	Secțiunea 1.1 **Date personale ale candidatului[1] cu cetățenie română/străină**				
1	Numele de familie la naștere (din certificatul de naștere)				
2	Numele de familie actual (după căsătorie, înfiere etc.)				
3	Prenumele				
4	Inițialele tatălui/mamei[2]				
5	CNP[3]				
6	Data nașterii	Anul	Luna		Ziua
7	Locul nașterii	Țara de origine		Județul/ Țara[4]	Localitatea
8	Sexul	F ☐ M ☐			
9	Starea civilă[5]	Căsătorit(ă) ☐	Necăsătorit(ă) ☐	Divorțat(ă) ☐ Văduv(ă) ☐	

10	Starea socială[6] specială	Orfan de un părinte ☐ sau de ambii părinți ☐		
		Provenit din case de copii ☐	Provenit din familie monoparentală ☐	
11	Cetățenia	Română, cu domiciliul în România/ în străinătate		
		Alte cetățenii		
		Cetățenie anterioară, dacă este cazul		
12	Etnia[7]			
13	Domiciliul stabil	Țara:	Județul[8]/ (Țara[9]):	
		Localitatea:		
		Adresă (stradă, număr, bloc, scară, etaj, apartament, sector)[10]		
14	Actul de identitate / Documentul de călătorie[11]	Seria:	Numărul:	
		Eliberat de:	Data eliberării:	
		Perioada de valabilitate		
15	Alte date personale ale candidatului	Telefon,	Adresă de e-mail	
16	Candidat care se încadrează în categoria persoanelor cu dizabilități	Se bifează numai de persoanele aflate în această situație, pe bază de documente		
	Secțiunea I.3.a - Date privind pregătirea anterioară a candidatului[12] (absolvent de liceu)			
1	Studiile preuniversitare absolvite, nivel liceu	Instituția unde a absolvit		
		Țara:	Localitatea:	
		Județul:	Filiera Profilul Specializarea	
		Durata studiilor:	Anul absolvirii:	
		Forma de învățământ (Zi / Seral / FR / ID)		
2	Datele de identificare ale diplomei	Tipul (diploma de bacalaureat sau echivalentă)		
		Seria		
		Numărul		

		Emisă de	
		Anul emiterii	
		Numărul foii matricole care însoțește actul de studii	
3	Alte observații (pentru cazurile în care candidatul a absolvit studii anterioare în străinătate)	Vizarea / Recunoașterea diplomei prezentate (DGRIE - acorduri bilaterale / DGISERSD-MECTS)	
		Nr. / Serie act de recunoaștere / echivalare (eliberat de DGRIE / DERD)[13]	

	Secțiunea I.3.b - Date privind pregătirea anterioară a candidatului[14] (absolvent de ciclu de învățământ universitar)			
1	Studiile universitare absolvite	Țara:	Localitatea:	
		Județul:		
		Denumirea instituției:		
		Facultatea:		
		Domeniul/ Profilul:		
		Programul de studii/ Specializarea:		
		Titlul obținut:	Forma de învățământ (zi/FR/ID/seral)	
		Forma de finantare a studiilor (buget/ taxă): Nr. de semestre finanțate de la buget:		
		Durata studiilor (ani):	Anul absolvirii:	
2	Datele de identificare ale actului de studii	Tipul – denumirea (diplomă/diplomă de licență/echivalentă)		
		Seria		
		Numărul		
		Emis de:		
		Anul emiterii:		
		Numărul suplimentului la diplomă/foii matricole care însoțește actul de studii		
3	Alte observații (pentru cazurile în care candidatul a	Vizarea/Recunoașterea diplomei prezentate (DGRIE - acorduri bilaterale/ DGISERSD-MECTS)		
		Nr./Serie act de recunoaștere/echivalare		

	absolvit studii în străinătate)	(eliberat de DGRIE / DERD)[15]	

#[1] La înscriere sau la modificarea datelor personale (după caz)

[2] Acolo unde este cazul (de exemplu: familie monoparentală)

#[3] Sau alt cod de identificare personală, pentru candidații străini

[4] Numai pentru candidații străini

#[5] Poate să nu fie declarată

[6] Se aplică doar candidaților cu o situație socială specială

#[7] Numai pentru candidații români (poate să nu fie declarată)

[8] Numai pentru candidații români

#[9] Numai pentru candidații străini

[10] Se solicită și pentru studenții străini

[11] Documentul de călătorie numai pentru candidații străini (act de identitate pentru cetățenii UE/ SEE sau pașaport pentru stduenții străini cu altă cetățenie decât UE/ SSE)

#[12] Pentru candidatul străin care vrea să studieze în România se va considera numai documentul care atestă recunoașterea/ echivalarea studiilor anterioare (document eliberat de DERD), care permit înscrierea în învățământul superior

#[13]Aplicabil pentru candidații români care au finalizat studiile anterioare în străinătate sau pentru candidații străini

[14] Se aplică și pentru candidații străini

[15] Idem 13

Prin transmiterea voluntară de către dumneavoastră a oricăror date personale sau informații, vă exprimați consimțământul pentru ca aceste date să fie colectate, înregistrate, stocate, prelucrate în bazele de date ale Academiei Române, precum și transferate către instituțiile față de care Academia Română are obligații legale.

Academia Română respectă toate obligațiile legale care îi revin în legătură cu prelucrarea de date personale.

Data: **Semnătura candidatului,**

Anexa 3

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ŞCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
DEPARTAMENTUL …….

PROPUNERE TEMĂ TEZĂ DE DOCTORAT

Numele și prenumele candidatului:
.....

Domeniul în care candidează: .....

Conducătorul științific:
.....

Tema propusă:.....
.....
.....

Importanța temei (Scurtă prezentare):

Anexa 4

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ŞCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
DEPARTAMENTUL .....

PROCES VERBAL

Încheiat astăzi ....., în urma desfășurării concursului de admitere la doctorat la forma *cu frecvență*, în domeniul de doctorat „.....", conducător științific .....
În baza aprobării Prezidiului Academiei Române din data de ....., referitoare la organizarea și desfășurarea admiterii la doctorat în anul universitar ....., comisia a examinat dosarele candidaților care și-au prezentat activitatea și temele pe care doresc să le dezvolte în cadrul tezelor de doctorat și a evaluat rezultatele probelor concursului:

Președinte:.....

Membri:.....

.....

.....

Numele și prenumele candidatului	Cod de atribuire	Nota obținută la examenul de ……. *	Nota obținută la proba orală	Nota obținută la prezentarea proiectului tematic de cercetare	Media obținută la colocviul de admitere la doctorat**

Ca urmare a aprecierii activității candidaților și a evaluării probelor de concurs, comisia a declarat:

ADMIȘI DOCTORANZI
BURSIERI:_____
_____

ADMIȘI DOCTORANZI FĂRĂ BURSĂ: ____
_____

RESPINȘI:_____

PREȘEDINTE,
MEMBRII COMISIEI,

1._____
2._____
3._____

_____

**pentru absolvenții cu diplomă de licență în alt domeniu decât cel ……..sau pentru cei care au absolvit în domeniul ……., dar notele obținute la disciplinele din domeniul de doctorat, rezultate din foia matricolă, sunt sub 8,00 (opt).*

***pentru declararea candidaților admiși/respinși comisia va ține cont numai de media obținută la colocviul de admitere la doctorat, cu condiția ca media la examenul de ……. să fie de cel puțin 8,00 (opt), iar calificativul la examenul de competență lingvistică la care nivelul minim să fie B2, conform cadrului de referință al Consiliului Europei (sunt condiții eliminatorii).*

Media minimă de admitere la doctorat este 8,00 (opt). Media se calculează cu două zecimale fără rotunjire.

METODOLOGIE
privind mobilitatea academică a studenților-doctoranzi

CADRUL LEGISLATIV

Ordinul nr. 5140/2019 privind aprobarea Metodologiei privind mobilitatea academică a studenților

CAPITOLUL I – Dispoziții generale

Art. 1.

(1) Mobilitatea academică reprezintă dreptul studenților doctoranzi de a li se recunoaște creditele transferabile dobândite, în condițiile legii, la alte instituții de învățământ superior acreditate/autorizate provizoriu din țară sau la alte programe de studii din cadrul Academiei Române. Mobilitatea poate fi definitivă sau temporară, pentru ciclul de învățământ „doctorat".

Art. 2.

Calitatea de student se menține pe perioada mobilităților.

Art. 3.

(1) Mobilitatea academică se poate efectua ca urmare a demersului studentului-doctorand cu îndeplinirea următoarelor condiții:

- existența unor acorduri interinstituționale
- acceptul instituțiilor de învățământ superior acreditate/autorizate provizoriu, după caz, de proveniență respectiv primitoare

(2) Acordurile interinstituționale stabilesc condițiile de desfășurare a mobilităților între instituțiile de învățământ superior acreditate/autorizate provizoriu: tipul mobilității, durata mobilității, numărul de mobilități, domeniul, programul de studiu, finanțarea mobilității temporare, limba de studiu, condiții de cazare etc.

(3) Acceptul interinstituțional constă în completarea și semnarea cererii-tip (Anexa nr. 1) de mobilitate, care face parte integrantă din prezenta metodologie, astfel:

a) student-doctorand depune cererea de mobilitate la instituția de învățământ superior unde dorește mobilitatea, în vederea obținerii acceptului;

b) după obținerea acceptului de mobilitate, studentul-doctorand, solicită mobilitate instituției de învățământ superior unde este înmatriculat;

c) instituția de învățământ superior care acceptă mobilitatea semnează prima cererea de mobilitate a studentului, apoi semnează instituția de la care pleacă studentul;

d) în cerere sunt trecute și condițiile în care are loc mobilitatea.

CAPITOLUL II - Mobilitatea academică temporară a studenților doctoranzi

Art. 4.

(1) Studentul sau studentul doctorand poate beneficia de mobilitate academică temporară între două instituții de învățământ superior acreditate/autorizate provizoriu, după caz.

(2) Compatibilitatea curriculei în vederea recunoașterii creditelor de studii transferabile se stabilește anterior perioadei de mobilitate, iar recunoașterea creditelor de studii transferabile se realizează după finalizarea mobilității, în conformitate cu acordul interinstituțional și regulamentele instituțiilor de învățământ superior implicate, după caz.

Art. 5.

(1) Mobilitatea academică temporară pe cont propriu reprezintă mobilitatea temporară efectuată în afara acordurilor interinstituționale de mobilitate academică, la solicitarea studentului care a identificat o posibilă universitate primitoare.

(2) Mobilitatea academică temporară pe cont propriu se realizează cu respectarea prevederilor art. 4 alin. (3); compatibilitatea curriculei în vederea recunoașterii creditelor de studii transferabile se stabilește anterior perioadei de mobilitate, iar recunoașterea creditelor de studii transferabile se realizează după finalizarea mobilității, în conformitate cu regulamentele instituțiilor de învățământ superior implicate, după caz.

Art. 6.

Mobilitatea academică temporară, pe locuri bugetate se poate realiza după finalizarea primului an de studii.

Art. 7.

Mobilitatea academică internațională temporară prin programe internaționale se realizează în conformitate cu reglementările ce privesc respectivele programe.

Art. 8.

(1) Mobilitatea academică temporară pe cont propriu reprezintă mobilitatea temporară efectuată în afara acordurilor interinstituționale de mobilitate academică, la solicitarea studentului care a identificat o posibilă universitate primitoare.

(2) Mobilitatea academică temporară pe cont propriu se realizează cu respectarea prevederilor art. 4 alin. (3); compatibilitatea curriculei în vederea recunoașterii creditelor de studii transferabile se stabilește anterior perioadei de mobilitate, iar recunoașterea creditelor de studii transferabile se realizează după finalizarea mobilității, în conformitate cu regulamentele instituțiilor de învățământ superior implicate, după caz.

Art. 9.

Mobilitatea academică temporară, pe locuri bugetate, se poate realiza după finalizarea primului an de studii.

Art. 10.

Mobilitatea academică internațională temporară prin programe internaționale se realizează în conformitate cu reglementările ce privesc respectivele programe.

CAPITOLUL III - Mobilitatea academică definitivă a studenților

Art. 11.

(1) Mobilitatea academică definitivă se poate efectua atât de către studenții finanțați de la bugetul de stat, cât și de către studenții cu taxă, cu respectarea prevederilor legale privind capacitatea de școlarizare și finanțarea învățământului superior și cu acceptul instituțiilor de învățământ superior acreditate/autorizate provizoriu implicate și în conformitate cu regulamentele proprii privind activitatea profesională a studenților.

(2) Mobilitatea academică definitivă se poate realiza și în cadrul aceleiași instituții de învățământ superior.

Art. 12.

(1) Pentru studiile universitare de licență și studiile universitare de master, mobilitatea academică definitivă se poate realiza numai la început de semestru, după primul semestru și până la sfârșitul penultimului semestru, între programe de studii cu același număr total de credite de studiu transferabile obligatorii, din aceeași ramură de știință.

(2) Pentru studiile universitare de doctorat, mobilitatea academică definitivă se poate efectua în cadrul aceluiași domeniu de doctorat, între școli doctorale acreditate, după finalizarea programului de pregătire bazat pe studii universitare avansate, cu respectarea prevederilor Codului de studii universitare de doctorat.

(3) Mobilitatea academică definitivă a studenților doctoranzi se poate efectua și în cadrul aceleiași școli doctorale pentru situații temeinic justificate privind conducătorii de doctorat (pensionare, deces etc.).

Art. 13.

(1) Înmatricularea se face cu respectarea prevederilor din regulamentul activității profesionale a studenților privind recunoașterea și echivalarea creditelor de studiu transferabile și a condițiilor de promovare a anilor de studii.

(2) Înmatricularea se realizează în conformitate cu cerințele legale privind înscrierea modificărilor în registrul matricol unic.

Art. 14.

În cazul mobilității academice definitive, diploma se emite absolventului de către instituția de învățământ superior care organizează examenul de finalizare a studiilor.

Art. 15.

Mobilitatea academică internă definitivă se face pe principiul "subvențiile urmează studentul".

Art. 16.

Prevederile privind mobilitatea academică definitivă se aplică și în cazul studenților și studenților doctoranzi proveniți din statele membre ale Uniunii Europene, Spațiului Economic European și din Confederația Elvețiană.

Art. 17.

Pentru țările terțe se aplică prevederile mobilității academice definitive, acordurilor bilaterale și acordurilor internaționale în materie, în vigoare la data efectuării mobilității.

ROMANIAN ACADEMY

INSTITUTE OF CELLULAR BIOLOGY AND PATHOLOGY "NICOLAE SIMIONESCU"

PhD THESIS

FACTORS MODULATING THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS FOR NEOVASCULARIZATION OF ISCHEMIC TISSUES

COORDINATOR:

ACAD. MAYA SIMIONESCU

PhD STUDENT:

GABRIELA GRIGORESCU

BUCHAREST

2013

THESIS TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION

PART I. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Chapter I.1. Cardiovascular diseases and the need for vascular regeneration

Chapter I.2. Structure of blood vessels

Chapter I.3. Physiological mechanisms of neovascularization

A. Vasculogenesis

B. Angiogenesis

i/ Sprouting angiogenesis

ii / Intussusception

C. Arteriogenesis

Chapter I.4. Experimental models to study blood vessel formation

Chapter I.5. Factors regulating blood vessel formation

A. Vascular endothelial growth factor (VEGF)

B. Angiopoietins

C. Fibroblast growth factor (FGF)

D. Platelet-derived growth factor (PDGF)

E. CXC chemokines

F. Anti-angiogenic factors

Chapter I.6. Strategies to induce vascular regeneration

A. Stem cells in vascular regeneration

i / General characteristics of stem cells

ii / Endothelial progenitor cells (EPC)

iii / Mesenchymal stem cells (MSC)

B. Experimental and clinical studies for vascular regeneration

PART II. ORIGINAL CONTRIBUTIONS

Chapter II.1. Human stem/progenitor cells - a source of endothelial cells for restoring blood perfusion of ischemic territory

A. Introduction and objectives

B. Early EPC derivation from peripheral blood

i/ Materials and methods

ii/ Results

C. Late EPC derivation from umbilical cord blood

i/ Materials and methods

ii/ Results

D. Endothelial potential of mesenchymal cells isolated from Wharton's jelly

i/ Materials and methods

ii/ Results

E. Endothelial potential of bone marrow stromal cells

i/ Materials and methods

ii/ Results

F. Discussion and conclusions

Chapter II.2. Enhancement of late EPC properties by soluble factors secreted by early EPC

A. Introduction and objectives

B. Materials and methods

C. Results and discussions

i/ Immunophenotyping of early and late EPC

ii/ Cumulative effect of late EPC with soluble factors secreted by early EPC on neovascularization using an in vivo model of Matrigel plug

iii/ Cumulative effect of late EPC with soluble factors secreted by early EPC on neovascularization using a hind limb ischemia model

D. Conclusions

Chapter II.3. VEGF secretion is not essential for the angiogenic effect of early EPC

A. Introduction and objectives

B. Materials and methods

C. Results and discussions

i/ Early EPC resistance to hypoxia

ii/ Paracrine properties of early EPC in normal and hypoxic conditions

iii / Factors secreted by early EPC in normal and hypoxic conditions

iv / Contribution of VEGF to angiogenic paracrine properties of early EPC

D. Conclusions

Chapter II.4. Effect of paracrine factors secreted by stem and progenitor cells on angiogenesis

A. Introduction and objectives

B. Materials and methods

C. Results

i / MSC resistance to hypoxia

ii/ Comparative evaluation of angiogenic factors secreted by MSC under normoxia and hypoxia

iii/ The cardioprotective effect of factors secreted by normal and hypoxic MSC

iv/ Chemoatractant properties of factors secreted by MSC under normoxia and hypoxia

v/ Effect of factors secreted by MSC under normal and hypoxic conditions on mature endothelial cell adhesion and proliferation

vi/ Opposite effects of EPC and MSC on mature endothelial cell adhesion and proliferation

vii/ Gene expression analysis in endothelial cells incubated simultaneously in the presence of factors secreted by MSC and early EPC

D. Discussion and conclusions

Chapter II.5. Double capacity of early EPC to secrete and capture SDF-1: a possible mechanism for neovascularization

A. Introduction and objectives

B. Materials and methods

C. Results and discussions

i/ Early EPC characterization

ii/ Comparative analysis of SDF-1 expression in early EPC and mature endothelial cells

iii/ Comparative analysis of SDF-1 expression in early EPC and leukocytes

iv/ Modulation of SDF-1 expression by inflammatory mediators

D. Conclusions

Chapter II.6. Dual role of SDF-1/CXCR4 axis for myocardial infarction, identified in transgenic mice deficient for CXCR4

A. Introduction and objectives

B. Materials and methods

C. Results

i/ Characterization of myocardial infarction in transgenic mice deficient for CXCR4

ii/ Post-infarct cardiac function analysis in transgenic mice deficient for CXCR4

iii/ Negative effect of CXCR4 expression in bone marrow cells over heart function after myocardial infarction

iv/ The beneficial role of CXCR4 in early EPC mobilization and function

v/ Apoptosis evaluation in infarcted myocardium in transgenic mice deficient for CXCR4

vi/ Ultrastructural peculiarities of the myocardium in transgenic mice deficient for CXCR4

vii/ Cardioprotective properties of phosphatidyl-serine isolated from myocardium of mice deficient for CXCR4

D. Discussion and conclusions

GENERAL CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHY

DISSEMINATION OF RESULTS OBTAINED DURING PhD

RESEARCH FUNDING

KEYWORDS

Neovascularization
Cardiovascular disease
Myocardial infarction
Ischemia
Hypoxia
Angiogenesis
Endothelial cells
Stem cells
Endothelial progenitor cells
Mesenchymal stem cells
Paracrine
VEGF
SDF-1
Chemotaxis
Cardioprotection

THESIS ABSTRACT

In the current context in which cardiovascular disease is the leading cause of mortality, elucidating the mechanisms underlying the process of new blood vessels formation in the adult (neovascularization), intensively preoccupies scientific community. Although numerous experimental studies and clinical trials using stem cells / progenitors to induce angiogenesis and myogenesis showed encouraging results (Gersh et al., 2009, Heil and Schaper, 2004; Lipinski et al., 2007, Mitsos et al. 2012), the mechanisms by which individual populations of stem cells / progenitor help improve cardiac function post-infarction are still incompletely understood (Gersh et al., 2009). A better understanding of these cellular therapies could increase their efficiency. Equally important, considering the ischemic environment which stem cells face after

transplantation into the infarcted myocardium, understanding the paracrine properties of stem cells in hypoxic conditions is essential. This would allow devise therapeutic strategies personalized to each patient, to overcome possible obstacles caused by pathological peculiarities. Optimization strategy could be done by choosing the most appropriate cell populations or combinations of the population, the use of only the factors secreted by them, by the choice of route of administration, and timing in relation to acute vascular accident. Furthermore, the cells to be injected may be preconditioned by stimulating with various cytokines or by blocking or over-expression of cytokine receptors (Herrmann et al., 2011, Richardson et al., 2013).

In this context, this thesis highlights several stem/progenitor cell populations with angio-/vasculogen potential and some of the mechanisms by which they contribute to neovascularization of ischemic tissues. Additionally to beneficial effect of these cell types on neovascularization, aiming to improve the function of infarcted myocardium, their ability to protect cardiac myocytes from hypoxic stress has also been evaluated. The thesis also investigates contribution of various paracrine factors to the therapeutic potential of stem/progenitor cells and modulation of their expression or of the paracrine properties of cells by hypoxia. In the last part of the thesis the influence of SDF-1/CXCR4 axis on the paracrine role of the progenitors and in cardiac remodeling after myocardial infarction (MI) are assessed.

The thesis is organized into two main parts containing 143 figures, of which 105 figures in the second part, 7 tables (in the second part), and 290 citations and extends over 233 pages.

In the first part, the Current State of Knowledge, organized into 6 chapters, firstly describes available therapeutic options, highlighting the need to develop new therapeutic strategies (Chapter I.1.). Then, after a brief description of the structure of blood vessels (Chapter I.2.), the physiological mechanisms of neovascularization are explained into detail (Chapter I.3.). Initially the terms vascular-, angio- and arteriogenesis are defined and then stages of angiogenesis (reorganization of basement membrane, of extracellular matrix, and cytoskeleton during endothelial cell (EC) migration, vessel maturation and stabilization) are described. In the fourth chapter (Chapter I.4.) several models that can be used to experimentally study vessel formation are presented, while the penultimate chapter (Chapter I.5.) describes key factors modulating neovascularization. The last chapter (Chapter I.6.), dedicated to the description of various strategies that may be used to induce neovascularization, firstly passes over the main types of

stem cells and their general properties, and then the characteristics of the two types of cells involved in neovascularization: endothelial progenitor cells (EPC) and mesenchymal stem cells (MSC) are given in detail. Finally a synthesis of current state of experimental and clinical studies is presented, successes and limitations being described.

In the second part of the thesis, the Original Contributions, studies were organized into six chapters. Initial studies focused on identifying potential populations of endothelial stem cells/progenitors (Chapter II.1.). The results show that from adult and fetal tissue sources that had been used (peripheral blood, umbilical cord blood, Wharton's jelly and bone marrow) the two types of EPC described in the literature (early and late) and mesenchymal stem/progenitor cells can be obtained. Endothelial potential of the latter is limited, but their secretory phenotype suggested their paracrine potential to stimulate neovascularization.

Numerous studies indicate that early and late EPC contribute to neovascularization by separate mechanisms, the early EPC having paracrine role, while late EPCs, being highly proliferative, are able to incorporate in new vessels (Asahara et al., 1997; Hur et al., 2004 Sieveking et al., 2008). It is also recognized that the formation of new blood vessels can be modulated by using a combination of angiogenic factors, the process being magnified when these factors are administrated/released sequentially (Freeman and Cohen, 2009, Hao et al., 2007). On the other hand, a study that examined the effect of co-administration of early and late EPC on neovascularization, using an in vivo model of hind limb ischemia, showed that the two cell types have a synergistic effect (Yoon et al., 2005). These data raise questions whether the beneficial effect obtained is dependent on factors released by early EPC, as a consequence of a dynamic response of these cells to the conditions encountered *in vivo*. To answer this question, using two *in vivo* models, we sought whether factors secreted *in vitro* by early EPC may improve neovascularization induced by late EPC (Chapter II.2.). The results show that in the presence of factors secreted *in vitro* by early EPC, late EPC included in a Matrigel plug, transplanted subcutaneously in mice, can organize into vascular structures merging with the vascular network of the host organism. Also late EPC transplantation in ischemic muscle, in the presence of factors secreted by early EPC, significantly increased tissue perfusion, an effect that could not be obtained at a similar level when late EPC or early EPC secreted factors were administered separately. Thus, we can conclude that factors released *in vitro* by early EPC are able to

significantly stimulate late EPC organization into new blood vessels, transplantation of early EPC being not mandatory.

Identification of factors contained by conditioned medium, that are responsible for its beneficial effect, will enable designing of a therapeutic compound that could be produced on a large scale and may be administered to an ischemic site, together with the late EPC, in order to improve tissue perfusion. Thus, from the results of the *in vivo* studies, we sought further to describe the paracrine factors responsible for the beneficial effect of early EPC (Chapter II.3.). We also investigated the influence of hypoxia on the secretory properties of early EPC and angiogenic and cardioprotective capacity of factors released by early EPC under normoxia and hypoxia. The cytokine profiling of early EPC revealed that they secrete numerous pro-angiogenic factors (VEGF, SDF-1, PlGF, Ang2, ET-1, IL-8, MCP-1, MMP10), and anti-angiogenic factors (TIMP-1, CXCL4), being thus able to contribute to maintaining of an angiogenic balance that would prevent pathological angiogenesis. We also showed that although hypoxia modulates secretory profile of early EPC, inducing an overall increase in secretion of factors involved in angiogenesis, including VEGF, these changes do not significantly influence the angiogenic effect of condition medium. Thus, to note, factors released by early EPC, both in normal conditions and in conditions of oxygen deprivation, are able to induce EC proliferation and migration, EC organization in vascular cords and protect cardiac myocytes from hypoxia induced apoptosis. Contribution of VEGF to paracrine angiogenic properties of early EPC was also investigated. The results showed that the presence of VEGF in conditioned medium from early EPC is not essential for the migration of EC or for EC organization in cords on Matrigel.

Next paracrine properties of mezenchimal stem cells (MSC) were investigated, following their ability to induce EC adherence and proliferation and to protect cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis (Chapter II.4.). Also, their potential was compared to early EPC properties and was evaluated under hypoxic conditions. The results showed that the factors secreted by MSC stimulate EC chemotaxis and adherence, but they are not able to induce the proliferation of EC; they also have beneficial effects on ischemic cardiomyocytes. Secretory activity of MSC is slightly modified as a result of exposure to hypoxia, but these changes do not affect their paracrine properties. Effects induced *in vitro* by early EPC are complementary to those induced by MSC, stimulating proliferation, but not EC adhesion. Both of these effects can be induced

simultaneously by combining the conditioned medium, suggesting that factors released from each of the two cell types are not sufficient to complete angiogenesis. This suggests that the combination of these two cell populations or of the factors secreted by them, angiogenesis can be induced successfully.

Neovasculogenesis is a process dependent on the activity of various cytokines such as VEGF, bFGF, angiopoietins and SDF-1 (Parsons-Wingerter et al., 2000 Visconti et al., 2002). The mechanisms by which they orchestrate neovascularization are still disputed. It is known that a gradient of SDF-1 is formed at an ischemic site, which causes the mobilization of bone marrow cells expressing CXCR4 and the receptor-ligand interaction triggers signaling cascades involved in the growth, proliferation and cell survival (Ganju et al. 1998, Petit et al., 2007, Roland et al., 2003). In this context, we sought further to evaluate the expression profile of SDF-1 by early EPC and we investigated whether paracrine role of these cells in neovasculogenesis is mediated by SDF-1 (Chapter II.5.). Also, given that SDF-1/CXCR4 interaction is exploited increasingly more to stem cell therapy after MI (Zhang et al., 2007), we proposed to study the function of CXCR4 in cardiac remodeling after MI in genetically modified mice ($CXCR4^{+/-}$) in order to identify possible adverse effects that pharmacological compounds may have (Chapter II.6.). The results showed that early EPCs secrete increased amounts of SDF-1 and are able to bind SDF-1 to their surface, thus creating a local gradient that may attract from circulation stem/progenitor cells $CXCR4^{+}$ with angio-/vasculogen potential. On the other hand, *in vivo* studies on transgenic mice demonstrate that CXCR4 has a double-edged effect on cardiac remodeling after MI. Thus, on one hand, mice $CXCR4^{+/-}$ presented smaller and more stable scars after IM, this associated with rather regenerator monocytic response and better adaptation of cardiac myocytes to hypoxic stress. On the other hand, early EPC function is impaired in transgenic mice, reduced myocardium neovascularization and the reduction of coronary flow recovery, being responsible for the lack of improvement of ventricular function. Thus, extrapolating these results to inhibit CXCR4 in human system should be done with caution.

In conclusion, the data contained in this thesis demonstrates that:

- Early and late EPC can be obtained from peripheral blood and cord blood

- Endothelial potential of stem/progenitor mesenchymal cells is limited, but this cell type can be exploited to stimulate neovascularization based on their paracrine properties

- Factors released *in vitro* by early EPC are able to significantly stimulate the formation of new vessels by late EPC, early EPC transplantation is not mandatory to achieve this effect.

- Early EPC maintains their paracrine properties under hypoxia and VEGF is not essential for their angiogenic effect.

- Paracrine factors secreted by MSC supports some of the processes involved in angiogenesis (support chemotaxis and adherence of EC, but not proliferation) and have beneficial effects on ischemic cardiomyocytes, and these properties are maintained when MSC are subject to hypoxia.

- *In vitro* effects of early EPC are complementary to those induced by MSC, stimulating proliferation, but not EC adhesion. Both of these effects can be induced simultaneously by combining the conditioned medium (obtained from the EPC and MSC). Thus, the combination of these two cell populations or factors secreted by them could be a successful strategy for inducing therapeutic angiogenesis.

- Early EPC secrete increased amounts of SDF-1 and are able to bind SDF-1 to their surface, thus creating a local gradient that can attract circulating stem/progenitor cells $CXCR4^{+}$ with angio-/vasculogenic potential to an ischemic site.

- CXCR4 presents a double-edged effect on myocardial remodeling after MI, its low expression causing the formation of smaller and more stable scars, but affecting cardiac neovascularization and recovery of ventricular function.

Based on the original results obtained during the doctoral internship new strategies can be envisaged that might optimize the therapy for revascularization of an ischemic territory. These preclinical data are likely to be strengthened in future clinical trials.

Bibliography

1. Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J.M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science *275*, 964-967.
2. Freeman, I., and Cohen, S. (2009). The influence of the sequential delivery of angiogenic factors from affinity-binding alginate scaffolds on vascularization. Biomaterials *30*, 2122-2131.
3. Ganju, R.K., Brubaker, S.A., Meyer, J., Dutt, P., Yang, Y., Qin, S., Newman, W., and Groopman, J.E. (1998). The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. The Journal of Biological Chemistry *273*, 23169-23175.
4. Gersh, B.J., Simari, R.D., Behfar, A., Terzic, C.M., and Terzic, A. (2009). Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective. Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic *84*, 876-892.
5. Hao, X., Silva, E.A., Mansson-Broberg, A., Grinnemo, K.H., Siddiqui, A.J., Dellgren, G., Wardell, E., Brodin, L.A., Mooney, D.J., and Sylven, C. (2007). Angiogenic effects of sequential release of VEGF-A165 and PDGF-BB with alginate hydrogels after myocardial infarction. Cardiovascular Research *75*, 178-185.
6. Heil, M., and Schaper, W. (2004). Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). Circulation Research *95*, 449-458.
7. Herrmann, J.L., Abarbanell, A.M., Weil, B.R., Manukyan, M.C., Poynter, J.A., Brewster, B.J., Wang, Y., and Meldrum, D.R. (2011). Optimizing stem cell function for the treatment of ischemic heart disease. The Journal of Surgical Research *166*, 138-145.
8. Hur, J., Yoon, C.H., Kim, H.S., Choi, J.H., Kang, H.J., Hwang, K.K., Oh, B.H., Lee, M.M., and Park, Y.B. (2004). Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *24*, 288-293.
9. Lipinski, M.J., Biondi-Zoccai, G.G., Abbate, A., Khianey, R., Sheiban, I., Bartunek, J., Vanderheyden, M., Kim, H.S., Kang, H.J., Strauer, B.E., *et al.* (2007). Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial

infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. J Am Coll Cardiol *50*, 1761-1767.

10. Mitsos, S., Katsanos, K., Koletsis, E., Kagadis, G.C., Anastasiou, N., Diamantopoulos, A., Karnabatidis, D., and Dougenis, D. (2012). Therapeutic angiogenesis for myocardial ischemia revisited: basic biological concepts and focus on latest clinical trials. Angiogenesis *15*, 1-22.
11. Parsons-Wingerter, P., Elliott, K.E., Clark, J.I., and Farr, A.G. (2000). Fibroblast growth factor-2 selectively stimulates angiogenesis of small vessels in arterial tree. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *20*, 1250-1256.
12. Petit, I., Jin, D., and Rafii, S. (2007). The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. Trends in Immunology *28*, 299-307.
13. Richardson, J.D., Nelson, A.J., Zannettino, A.C., Gronthos, S., Worthley, S.G., and Psaltis, P.J. (2013). Optimization of the cardiovascular therapeutic properties of mesenchymal stromal/stem cells-taking the next step. Stem Cell Reviews *9*, 281-302.
14. Roland, J., Murphy, B.J., Ahr, B., Robert-Hebmann, V., Delauzun, V., Nye, K.E., Devaux, C., and Biard-Piechaczyk, M. (2003). Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. Blood *101*, 399-406.
15. Sieveking, D.P., Buckle, A., Celermajer, D.S., and Ng, M.K. (2008). Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay. J Am Coll Cardiol *51*, 660-668.
16. Visconti, R.P., Richardson, C.D., and Sato, T.N. (2002). Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 8219-8224.
17. Zhang, M., Mal, N., Kiedrowski, M., Chacko, M., Askari, A.T., Popovic, Z.B., Koc, O.N., and Penn, M.S. (2007). SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *21*, 3197-3207.

L'ACADEMIE ROUMAINE

Institut de Biologie et Pathologie Cellulaire

"Nicolae Simionescu", Bucarest

THESE DE DOCTORAT

Facteurs modulateurs du potentiel thérapeutique des cellules progénitrices endothéliales dans la néovascularisation du tissu ischémique

Directeur de doctorat

Acad. Maya Simionescu

Doctorant

Gabriela Grigorescu

2013

CONTENU

INTRODUCTION

PARTIE I. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

Chapitre I.1. Les maladies cardiovasculaires et la nécessité de régénération vasculaire

Chapitre I.2. La structure des vaisseaux sanguins

Chapitre I.3. Les mécanismes physiologiques de la néovascularisation

A. La vasculogénèse

B. L'angiogenèse

i/ L'angiogenèse par bourgeonnement

ii/ L'angiogenèse par intussusceptie ou segmentation

C. L'arteriogenèse

Chapitre I.4. Les modèles expérimentaux utilisés pour l'étude des vaisseaux sanguins

Chapitre I.5. Les facteurs impliqués dans la formation des vaisseaux sanguins

A. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)

B. Les angiopoïétines

C. Le facteur de croissance des fibroblastes (FGF)

D. Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)

E. Les chimiokines de type CXC

F. Les facteurs anti-angiogéniques

Chapitre I.6. Les stratégies visant à induire la régénération vasculaire

A. Les cellules souches impliquées dans la régénération vasculaire

i/ Caractéristiques générales des cellules souches

ii/ Les cellules progénitrices endothéliales (EPC)

iii/ Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

B. Des études expérimentales et cliniques sur la régénération vasculaire

PARTEA a II-a. CONTRIBUTIONS ORIGINALES

Chapitre II.1. Les cellules souches / progénitrices humaines - une source de cellules endothéliales pour rétablir l'irrigation sanguine du territoire ischémique

A. Introduction et objectifs

B. Isolement des EPC précoces à partir du sang périphérique

i/ Matériel et méthodes

ii/ Résultats

C. Isolement des EPC tardives à partir du sang du cordon ombilical

i/ Matériel et méthodes

ii/ Résultats

D. Le potentiel endothélial des cellules mésenchymateuses isolées à partir de la gelée de Wharton

i/ Matériel et méthodes

ii/ Résultats

E. Le potentiel endothélial des cellules stromales médullaires

i/ Matériel et méthodes

ii/ Résultats

F. Discussion et conclusions

Chapitre II.2. La potentialisation des effets des EPC tardives par les facteurs solubles sécrétés par les EPC précoces

A. Introduction et objectifs

B. Matériel et méthodes

C. Résultats et discussion

i/ Analyse immunophénotypique des EPC précoces et tardives

ii/ L'effet cumulatif des EPC tardives et des facteurs solubles sécrétés par les EPC précoces sur la néovascularisation dans le modèle d'implant Matrigel in vivo

iii/ L'effet cumulatif des EPC tardives et des facteurs solubles sécrétés par les EPC précoces sur la néovascularisation dans le modèle d'ischémie fémorale

D. Conclusions

Chapitre II.3. La sécrétion de VEGF n'est pas indispensable pour l'effet angiogénique des EPC précoces

A. Introduction et objectifs

B. Matériel et méthodes

C. Résultats et discussion

i/ Résistance des EPC à l'hypoxie

ii/ Les propriétés paracrines des EPC précoces en conditions normales et hypoxique

iii/ Les facteurs sécrétés par les EPC précoces en conditions normales et hypoxique

iv/ Contribution du VEGF aux propriétés paracrines angiogéniques des EPC précoces

D.Conclusions

Chapitre II.4. L'effet paracrine des facteurs sécrétée par les cellules souches et progénitrices dans la stimulation de l' angiogenèse

A. Introduction et objectifs

B. Matériel et méthodes

C. Résultats

i/ Résistance des MSC à l'hypoxie

ii/ Évaluation comparative des facteurs angiogéniques sécrétés par les MSC en normoxie et conditions hypoxiques

iii/ L'effet protecteur des facteurs sécrétés par les MSC normales et hypoxiques sur les myocytes cardiaques

iv/ Les propriétés chimioattractives des facteurs sécrétés par les MSC en normoxie et hypoxie

v/ L'effet de facteurs sécrétés par le MSC dans des conditions normales et hypoxique sur l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales matures

vi/ Les effets opposés des EPC et MSC sur l'adhésion des cellules endothéliales matures

vii/ L'analyse de l'expression des gènes des cellules endothéliales incubées simultanément en présence des facteurs sécrétés par les MSC et EPC précoces

D. Discussion et conclusions

Chapitre II.5. Double propriété des EPC précoces de relâcher et capturer SDF-1: un mécanisme possible pour la néovascularisation

A. Introduction et objectifs

B. Matériel et méthodes

C. Résultats et discussion

i/ Caractérisation des EPC précoces

ii/ Analyse comparative de l'expression de SDF-1 dans les EPC précoces et les cellules endothéliales matures

iii/ Analyse comparative de l'expression de SDF-1 dans les EPC précoces et les leucocytes mononucléaires

iv/ Modulation de l'expression SDF-1 par les médiateurs inflammatoires

D. Conclusions

Chapitre II.6. Double rôle de l’axe SDF-1/CXCR4 dans l'infarctus du myocarde identifié chez les souris transgéniques déficientes en CXCR4

A. Introduction et objectifs

B. Matériel et méthodes

C. Résultats

i/ Caractérisation de l'infarctus du myocarde chez les souris transgéniques déficientes en CXCR4

ii/ L'analyse de la fonction cardiaque post-infarctus chez les souris transgéniques déficientes en CXCR4

iii/ L'effet négatif de CXCR4 provenant des cellules de la moelle osseuse sur la fonction cardiaque post-infarctus

iv/ Le rôle bénéfique de CXCR4 pour la mobilisation et de la fonction des EPC précoces

v/ L'évaluation de l'apoptose dans les infarctus du myocarde chez les souris transgéniques déficientes en CXCR4

vi/ Particularités ultrastructurales du myocarde chez les souris transgéniques déficientes en CXCR4

vii/ Propriétés cardioprotectrices de la phosphatidylsérine isolée du myocarde des souris déficientes en CXCR4

D. Discussion et conclusions

CONCLUSIONS GENERALES

RÉFÉRENCES

DIFFUSION DES RÉSULTATS OBTENUS DANS LA THÈSE

FINANCEMENT DE LA RECHERCHE

MOTS-CLÉS

Néovascularisation
Maladies cardiovasculaires
Infarctus du myocarde
Ischémie
Hypoxie
Angiogenèse
Cellules endothéliales
Cellules souches
Cellules progénitrices endothéliales
Cellules souches mésenchymateuses
Paracrine
VEGF
SDF-1
Chimiotaxie
Cardioprotection

RÉSUMÉ

Dans le contexte actuel dans lequel les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité, l'élucidation des mécanismes qui sous-tendent le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins chez l'adulte (néovascularisation), préoccupe fortement la communauté scientifique. Bien que de nombreuses études expérimentales et des essais cliniques visant les cellules souches / progénitrices pour induire l'angiogenèse et la myogenèse ont montré des résultats encourageants (Gersh et al, 2009, Heil et Schaper, 2004;. Lipinski et al, 2007, Mitsos et al.. 2012), les mécanismes par lesquels les différentes populations de cellules souches / progénitrices aident à améliorer la fonction cardiaque post-AVC sont encore mal connues (Gersh et al., 2009). Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait accroître l'efficacité des thérapies cellulaires. Également, compte tenu de l'environnement ischémique dans lequel les cellules souches arrivent après la

transplantation au niveau de l'infarctus du myocarde, il est primordial de comprendre les propriétés paracrines des cellules souches dans des conditions hypoxiques. Cela permettrait de concevoir des stratégies thérapeutiques adaptées à chaque patient, afin de surmonter les obstacles éventuels causés par les caractéristiques pathologiques. L'optimisation de la stratégie pourrait être faite par le choix des populations cellulaires les plus appropriées ou des combinaisons des populations ou en utilisant uniquement des facteurs sécrétés par eux-mêmes, mais aussi par le choix de la voie d'administration et du moment de la transplantation par rapport à un accident vasculaire aigu. En outre, les cellules à injecter peuvent être préconditionnées par la stimulation avec diverses cytokines ou un bloc ou sur-expression du récepteur (Herrmann et al. 2011, Richardson et al., 2013).

Dans ce contexte, cette thèse met en évidence les populations de cellules souches / progénitrices qui présentent un potentiel angio-/vasculogène et aussi certains des mécanismes par lesquels ils contribuent à la néovascularisation des tissus ischémiques. En outre, en visant principalement l'amélioration de la fonction du myocarde après un infarctus, on a suivi non seulement l'effet bénéfique de ces types de cellules sur la néovascularisation, mais aussi la protection des myocytes cardiaques exposés à un stress hypoxique. Aussi, par l'intermède des études effectuées, on a examiné également la contribution des divers facteurs paracrines au potentiel thérapeutique des cellules souches / progénitrices et aussi le changement d'expression et des propriétés paracrines dans un milieu hypoxique. Dans la dernière partie, la contribution de l'axe SDF-1/CXCR4 au rôle paracrine des cellules progénitrices et la fonction de CXCR4 dans le remodelage cardiaque après un infarctus du myocarde ont été évaluées.

La thèse, qui couvre 233 pages, est divisée en deux parties comprenant 143 figures (dont 105 se trouvent dans la deuxième partie), 7 tables (dans la seconde partie) et 290 citations.

Dans la première partie, -L'état actuel des connaissances-, organisée en 6 chapitres, l'auteur a presenté d'abord les options thérapeutiques disponibles, soulignant ainsi la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques (Chapitre I.1.). Ensuite, après une brève description de la structure des vaisseaux sanguins (Chapitre I.2.), on a fait une incursion dans les mécanismes physiologiques de la néovascularisation (Chapitre I.3.), en définissant les termes vasculo-, angio- et arteriogenèse. Les étapes de l'angiogenèse (réorganisation de la membrane basale, de la matrice extracellulaire et du cytosquelette lors de la migration des

cellules endothéliales, la maturation et la stabilisation du vaisseau) sont décrites en détail. Le quatrième chapitre (Chapitre I.4.) présente plusieurs modèles sur lesquels peut être étudiée expérimentalement la formation de vaisseaux, et dans l'avant-dernier chapitre (Chapitre I.5.), les principaux facteurs qui modulent la néovascularisation sont présentés. Le dernier chapitre (Chapitre I.6) est consacré à la description des différentes stratégies qui peuvent être utilisées pour l'induction de la néovascularisation, en passant d'abord en revue les principaux types de cellules souches et leurs propriétés générales et ensuite en détaillant les caractéristiques des deux types de cellules impliquées dans la néovascularisation : des cellules progénitrices endothéliales (EPC) et les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Enfin, l'auteur a synthétisé l'état actuel des études expérimentales et cliniques, en décrivant leur succès et leurs limites.

Dans la deuxième partie de la thèse, -Les contributions originales-, les études ont été organisées en six chapitres. Les premières études ont été axées sur l'identification du potentiel endothélial de certaines populations de cellules souches / progénitrices (**Chapitre II.1.**). Les résultats ont montré que les deux types d'EPC décrits dans la littérature (précoces et tardives), aussi que des CSM, peuvent être obtenus à partir de quelques sources tissulaires comme le sang périphérique, le sang du cordon ombilical, la gelée de Wharton et la moelle osseuse. Le potentiel endothélial des CSM est réduit, mais le phénotype sécrétoire a toujours suggéré de suivre leurs propriétés paracrines afin de stimuler la néovascularisation.

De nombreuses études appuient la contribution des EPC précoces et tardives au processus de néovascularisation par des mécanismes distincts: les premières ayant un rôle paracrine, tandis que les EPC tardives, ayant un potentiel de prolifération élevé, ont la possibilité de s'intégrer dans les vaisseaux en formation (Asahara et al, 1997;. Hur et al. 2004 Sieveking et al., 2008). Il est également reconnu que la formation de nouveaux vaisseaux peut être modulée en utilisant une combinaison de facteurs angiogéniques. Le processus peut être amplifié lorsque ces facteurs sont administrés de manière séquentielle (Freeman et Cohen 2009, Hao et al., 2007). D'autre part, une étude qui a examiné l'effet de la co-administration des EPC précoces et tardives sur la néovascularisation en utilisant un modèle in vivo d'ischémie fémorale, a montré que les deux types de cellules ont un effet synergique (Yoon et al., 2005). Ces données soulèvent la question si l'effet bénéfique obtenu dépend de facteurs libérés par les EPC précoces, en raison d'une réponse dynamique de ces cellules aux conditions rencontrées in vivo. Pour répondre à cette question, en utilisant deux

modèles in vivo, nous avons cherché si les facteurs sécrétés in vitro au début par les EPC précoces peuvent améliorer la néovascularisation induite par les EPC tardives (**Chapitre II.2.**).

Les résultats montrent qu'en présence de facteurs sécrétés par les EPC précoces in vitro, les EPC tardives incluses dans un morceau de Matrigel et transplantées de manière sous-cutanée chez la souris peuvent être organisées dans les structures vasculaires qui ont la capacité de fusionner avec le réseau vasculaire de l'organisme hôte. Également, la transplantation des EPC tardives dans le muscle ischémique en présence des facteurs sécrétés par les EPC précoces augmente significativement la perfusion tissulaire; un effet qui n'est pas obtenu à un niveau similaire lorsque les EPC tardives ou les facteurs sécrétés par les EPC précoces sont administrés séparément. Ainsi, nous pouvons conclure que les facteurs libérés in vitro par les EPC précoces sont capables de stimuler de manière significative la formation de nouveaux vaisseaux par les EPC tardives, et l'administration des EPC précoces n'est pas nécessaire pour obtenir cet effet positif.

L'identification des facteurs appartenant au milieu conditionné responsables de l'effet bénéfique permettra la formulation d'un composé thérapeutique qui peut être produit à grande échelle et qui peut être administré à un site ischémique, conjointement avec des EPC tardives, afin d'améliorer la perfusion tissulaire. Ainsi, à partir des résultats des études in vivo, nous avons cherché une description plus détaillée des facteurs paracrines responsables de l'effet bénéfique des EPC précoces (**Chapitre II.3.**). Nous avons aussi étudié l'influence de l'hypoxie sur les propriétés de sécrétion des EPC précoces et la capacité angiogénique et cardioprotectrice des facteurs libérés par les EPC précoces en conditions de normoxie et d'hypoxie. Le profil des cytokines des EPC précoces montre qu'ils sécrètent de nombreux facteurs pro-angiogéniques (VEGF, SDF-1, PIGF, Ang2, ET-1, IL-8, MCP-1, MMP10) et anti-angiogéniques (TIMP-1, CXCL4), ce qui suggère la contribution des EPC précoces à la maintenance de l'équilibre angiogénique qui pourrait empêcher l'angiogenèse pathologique. Nous avons également montré que, bien que l'hypoxie module le profil de sécrétion des EPC précoces, en augmentant la sécrétion globale des facteurs de croissance impliqués dans l'angiogenèse, y compris VEGF, ces changements n'influencent pas de manière significative l'effet angiogénique du milieu conditionné. Ainsi, on peut remarquer que les facteurs libérés par les EPC précoces, dans conditions normales aussi que dans les conditions de privation d'oxygène, sont capables d'induire la migration et la prolifération

des CE, l'organisation des EC en cordons et de protéger les myocytes cardiaques de l'apoptose induite par l'hypoxie. On a également étudié la contribution du VEGF aux propriétés angiogéniques des EPC précoces. Les résultats ont montré que la présence de VEGF dans le milieu conditionné des EPC précoces n'est pas essentielle pour la migration de des CE ou pour la formation des cordons des CE sur Matrigel.

Ensuite, on a étudié les propriétés paracrines des MSC, en suivant leur capacité à induire l'adhésion et la prolifération des CE et de protéger les myocytes cardiaques de l'apoptose induite par l'hypoxie (**Chapitre II.4.**). Également, le potentiel des MSC a été comparé à celui des EPC précoces et a été évalué dans des conditions hypoxiques. Les résultats ont montré que les facteurs sécrétés par les MSC stimulent le chimiotactisme et l'adhésion des CE, mais ils ne sont pas capables d'induire la prolifération des CE; en outre, ils ont des effets bénéfiques sur les cellules musculaires cardiaques ischémiques. L'activité sécrétoire des MSC est légèrement modifiée à la suite de l'exposition à l'hypoxie, mais apparemment ces changements n'affectent pas les effets paracrines. Les effets induits par les EPC précoces in vitro sont complémentaires à ceux induits par les MSC, en stimulant la prolifération, mais pas l'adhésion des CE. Ces deux effets peuvent être induits simultanément en combinant les milieux conditionnés, ce qui suggère que les facteurs libérés par chacun des deux types de cellules ne sont pas suffisants pour compléter l'angiogenèse. Ceci suggère que la combinaison de ces deux populations cellulaires ou des facteurs sécrétés par eux-mêmes, permettrait d'induire l'angiogenèse avec succès.

Le processus de neovasculogenèse dépend de l'activité des différentes cytokines tels que le VEGF, bFGF, les angiopoïétines et SDF-1 (-Wingerter Parsons et al., 2000 Visconti et al., 2002). Les mécanismes par lesquels ils orchestrent la néovascularisation sont encore contestés. On sait qu'au niveau d'un milieu ischémique, un gradient de SDF-1 est formé, ce qui provoque la mobilisation de cellules de moelle osseuse exprimant du CXCR4. En plus, l'interaction récepteur-ligand déclenche des cascades de signalisation impliquées dans la survie, la croissance et la prolifération cellulaires (Ganju et al. 1998 Petit et al. 2007, Roland et al., 2003). Dans ce contexte, nous avons investigué le profil d'expression du SDF-1 des EPC précoces et nous avons examiné si le rôle paracrine de ces cellules dans la néovasculogenèse est médié par SDF-1 (**Chapitre II.5.**).

De plus, étant donné que l'interaction SDF-1/CXCR4 est exploitée de plus en plus dans l'utilisation de la thérapie cellulaire après un IM (Zhang et al., 2007), nous avons étudié la fonction de CXCR4 dans le remodelage cardiaque après IM chez les souris génétiquement modifiées IM ($CXCR4^{+/-}$), afin d'identifier les éventuels effets néfastes des composés pharmacologiques (**Chapitre II.6.**). Les résultats ont montré que les EPC précoces sécrètent des quantités accrues de SDF-1 et sont capables de lier SDF-1 à leur surface, créant ainsi un gradient local qui attire des cellules souches / progénitrices $CXCR4^{+}$ au potentiel angio-/vasculogen en circulation. D'autre part, les études in vivo sur les souris transgéniques ont montré que CXCR4 a un effet à double tranchant sur le remodelage cardiaque après un infarctus du myocarde. Ainsi, d'une part, les souris $CXCR4^{+/-}$ ont présenté après IM des cicatrices plus petites et plus stables, associées avec une réponse monocytique plutôt régénératrice et une meilleure adaptation des myocytes cardiaques au stress hypoxique. D'autre part, la fonction des EPC précoces a été affectée, ce qui a résulté dans la réduction de la néovascularisation du myocarde et du rétablissement du débit coronaire, qui sont ensemble responsables de l'absence d'amélioration de la fonction ventriculaire. Ainsi, en extrapolant ces résultats, l'inhibition du CXCR4 dans le système humain doit être faite avec prudence.

En conclusion, les données contenues dans cette thèse démontrent que:

- Les EPC précoces et tardives peuvent être obtenues à partir du sang périphérique et du sang du cordon ombilical

- Le potentiel endothélial des cellules souches / progénitrices mésenchymateuses est limité, mais ce type de cellule peut être exploité pour stimuler la néovascularisation à l'aide de leurs propriétés paracrines

- Les facteurs libérés in vitro par les EPC précoces sont capables de stimuler de manière significative la formation de nouveaux vaisseaux par les EPC tardives ; ainsi, la transplantation des EPC précoces n'est pas nécessaire pour obtenir cet effet.

- Les EPC précoces maintiennent leurs propriétés paracrines en conditions hypoxiques et VEGF n'est pas essentiel pour leur effet angiogénique.

- Les facteurs paracrines sécrétés par CSM soutiennent certains des processus impliqués dans l'angiogenèse (soutiennent le chimiotactisme et l'adhésion des CE, mais pas la

prolifération) et ont des effets bénéfiques sur les myocytes cardiaques ischémiques ; ces propriétés sont maintenues lorsque les MSC sont soumis à l'hypoxie.

- Les effets induits in vitro des EPC précoces sont complémentaires à ceux induits par CSM ; ainsi ils stimulent la prolifération, mais pas l'adhésion des CE. Ces deux effets peuvent être induits simultanément en combinant les deux milieux conditionnés (obtenus à partir de la EPC et CSM). La combinaison de ces deux populations cellulaires ou des facteurs sécrétés par eux, pourrait être une stratégie efficace pour induire l'angiogenèse thérapeutique.

- Les EPC précoces sécrètent des quantités accrues de SDF-1 et sont capables de lier SDF-1 sur leur surface, créant ainsi un gradient local qui peut attirer du trafic de cellules souches / progénitrices $CXCR4^{+}$ au potentiel angio-/vasculogène vers un site ischémique.

- CXCR4 présente un effet à double tranchant sur le remodelage myocardique après un IM ; son expression faible cause la formation des cicatrices plus petites et plus stables, mais affecte la néovascularisation cardiaque et la récupération de la fonction ventriculaire.

Les points de repère fondés sur des résultats originaux obtenus pendant le stage doctoral permettent l'élaboration des stratégies qui conduiront à l'optimisation du traitement de vascularisation d'un territoire ischémique. Ces données précliniques seront renforcées dans le futur par des essais cliniques.

Références

1. Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J.M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science *275*, 964-967.
2. Freeman, I., and Cohen, S. (2009). The influence of the sequential delivery of angiogenic factors from affinity-binding alginate scaffolds on vascularization. Biomaterials *30*, 2122-2131.
3. Ganju, R.K., Brubaker, S.A., Meyer, J., Dutt, P., Yang, Y., Qin, S., Newman, W., and Groopman, J.E. (1998). The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. The Journal of Biological Chemistry *273*, 23169-23175.
4. Gersh, B.J., Simari, R.D., Behfar, A., Terzic, C.M., and Terzic, A. (2009). Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective. Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic *84*, 876-892.
5. Hao, X., Silva, E.A., Mansson-Broberg, A., Grinnemo, K.H., Siddiqui, A.J., Dellgren, G., Wardell, E., Brodin, L.A., Mooney, D.J., and Sylven, C. (2007). Angiogenic effects

of sequential release of VEGF-A165 and PDGF-BB with alginate hydrogels after myocardial infarction. Cardiovascular Research *75*, 178-185.
6. Heil, M., and Schaper, W. (2004). Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). Circulation Research *95*, 449-458.
7. Herrmann, J.L., Abarbanell, A.M., Weil, B.R., Manukyan, M.C., Poynter, J.A., Brewster, B.J., Wang, Y., and Meldrum, D.R. (2011). Optimizing stem cell function for the treatment of ischemic heart disease. The Journal of Surgical Research *166*, 138-145.
8. Hur, J., Yoon, C.H., Kim, H.S., Choi, J.H., Kang, H.J., Hwang, K.K., Oh, B.H., Lee, M.M., and Park, Y.B. (2004). Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *24*, 288-293.
9. Lipinski, M.J., Biondi-Zoccai, G.G., Abbate, A., Khianey, R., Sheiban, I., Bartunek, J., Vanderheyden, M., Kim, H.S., Kang, H.J., Strauer, B.E., *et al.* (2007). Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. J Am Coll Cardiol *50*, 1761-1767.
10. Mitsos, S., Katsanos, K., Koletsis, E., Kagadis, G.C., Anastasiou, N., Diamantopoulos, A., Karnabatidis, D., and Dougenis, D. (2012). Therapeutic angiogenesis for myocardial ischemia revisited: basic biological concepts and focus on latest clinical trials. Angiogenesis *15*, 1-22.
11. Parsons-Wingerter, P., Elliott, K.E., Clark, J.I., and Farr, A.G. (2000). Fibroblast growth factor-2 selectively stimulates angiogenesis of small vessels in arterial tree. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *20*, 1250-1256.
12. Petit, I., Jin, D., and Rafii, S. (2007). The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. Trends in Immunology *28*, 299-307.
13. Richardson, J.D., Nelson, A.J., Zannettino, A.C., Gronthos, S., Worthley, S.G., and Psaltis, P.J. (2013). Optimization of the cardiovascular therapeutic properties of mesenchymal stromal/stem cells-taking the next step. Stem Cell Reviews *9*, 281-302.
14. Roland, J., Murphy, B.J., Ahr, B., Robert-Hebmann, V., Delauzun, V., Nye, K.E., Devaux, C., and Biard-Piechaczyk, M. (2003). Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. Blood *101*, 399-406.
15. Sieveking, D.P., Buckle, A., Celermajer, D.S., and Ng, M.K. (2008). Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay. J Am Coll Cardiol *51*, 660-668.
16. Visconti, R.P., Richardson, C.D., and Sato, T.N. (2002). Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 8219-8224.
17. Zhang, M., Mal, N., Kiedrowski, M., Chacko, M., Askari, A.T., Popovic, Z.B., Koc, O.N., and Penn, M.S. (2007). SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *21*, 3197-3207.

ACADEMIA ROMÂNĂ

INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ
”NICOLAE SIMIONESCU”

TEZA DE DOCTORAT

FACTORI MODULATORI AI POTENȚIALULUI TERAPEUTIC AL CELULELOR ENDOTELIALE PROGENITOARE ÎN NEOVASCULARIZAREA ȚESUTULUI ISCHEMIC

Conducător științific:
Acad. MAYA SIMIONESCU

Doctorand:
GABRIELA GRIGORESCU

BUCUREȘTI
2013

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE

PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTINȚELOR

Capitolul I.1. Bolile cardiovasculare și necesitatea regenerării vasculare

Capitolul I.2. Structura vaselor de sânge

Capitolul I.3. Mecanismele fiziologice ale neovascularizării.

A. Vasculogeneza

B. Angiogeneza

i/ Angiogeneza prin înmugurire

ii/ Angiogeneza prin intussuscepțiune sau segmentare

C. Arteriogeneza

Capitolul I.4. Modele experimentale pentru studiul formării vaselor de sânge

Capitolul I.5. Factorii implicați în formarea vaselor de sânge

A. Factorul de creștere a endoteliului vascular (VEGF)

B. Angiopoietinele

C. Factorul de creștere a fibroblaștilor (FGF)

D. Factorul de creștere derivat din plachete (PDGF)

E. Chemokinele de tip CXC

F. Factorii anti-angiogeni

Capitolul I.6. Strategii de inducere a regenerării vasculare

A. Celulele stem în regenerarea vasculară

i/ Caracteristici generale ale celulelor stem

ii/ Celulele endoteliale progenitoare (EPC)

iii/ Celulele stem mezenchimale (MSC)

B. Studii experimentale și clinice asupra regenerării vasculare

PARTEA a II-a. CONTRIBUȚII ORIGINALE

Capitolul II.1. Celulele stem/progenitoare umane - sursă de celule endoteliale pentru refacerea perfuziei sanguine a unui teritoriu ischemic

A. Introducere și obiective

B. Obținerea EPC timpurii din sânge periferic

i/ Materiale și metode

ii/ Rezultate

C. Obținerea EPC târzii din sânge din cordonul ombilical

i/ Materiale și metode

ii/ Rezultate

D. Potențialul endotelial al celulelor mezenchimale izolate din gelatina Wharton

i/ Materiale și metode

ii/ Rezultate

E. Potențialul endotelial al celulelor stromale medulare

i/ Materiale și metode

ii/ Rezultate

F. Discuții și concluzii

Capitolul II.2. Potențarea efectelor EPC târzii de către factorii solubili secretați de EPC timpurii

A. Introducere și obiective

B. Materiale și metode

C. Rezultate și discuții

i/ Analiza imunofenotipică a EPC timpurii și târzii

ii/ Efectul cumulat al EPC târzii cu factorii solubili secretați de EPC timpurii asupra neovascularizării pe model de implant de matrigel *in vivo*

iii/ Efectul cumulat al EPC târzii cu factorii solubili secretați de EPC timpurii asupra neovascularizării pe model de ischemie femurală

D. Concluzii

Capitolul II.3. Secreția VEGF nu este esențială pentru efectul angiogen al EPC timpurii

A. Introducere și obiective

B. Materiale și metode

C. Rezultate și discuții

i/ Rezistența EPC timpurii la hipoxie

ii/ Proprietățile paracrine ale EPC timpurii în condiții normale și hipoxice

iii/ Factorii secretați de EPC timpurii în condiții normale și hipoxice

iv/ Contribuția VEGF la proprietățile paracrine angiogene ale EPC timpurii

D. Concluzii

Capitolul II.4. Efectul paracrin al factorilor secretați de celulele stem și progenitoare în stimularea agiogenezei

A. Introducere și obiective

B. Materiale și metode

C. Rezultate

i/ Rezistența MSC la hipoxie

ii/ Evaluarea comparativă a factorilor angiogeni secretați de MSC în condiții normoxice și hipoxice

iii/ Efectul protector al factorilor secretați de MSC normale și hipoxice asupra miocitelor cardiace

iv/ Proprietățile chemoatractante ale factorilor secretați de MSC normoxice și hipoxice

v/ Efectul factorilor secretați de MSC în condiții normale și hipoxice asupra aderării și proliferării celulelor endoteliale mature

vi/ Efectele opuse ale EPC și MSC asupra aderării și proliferării celulelor endoteliale mature

vii/ Analiza expresiei genice a celulelor endoteliale incubate simultan în prezența factorilor secretați de MSC și EPC timpurii

D. Discuții și concluzii

Capitolul II.5. Dubla proprietate a EPC timpurii de a secreta și capta SDF-1: un posibil mecanism pentru neovascularizare

A. Introducere și obiective

B. Materiale și metode

C. Rezultate și discuții

i/ Caracterizarea EPC timpurii

ii/ Analiza comparativă a expresiei SDF-1 în EPC timpurii și celulele endoteliale mature

iii/ Analiza comparativă a expresiei SDF-1în EPC timpurii și leucocitele mononucleate

iv/ Modularea expresiei SDF-1 de către mediatorii inflamației

D. Concluzii

Capitolul II.6. Rolul dual al axei SDF-1/CXCR4 în infarctul de miocard identificat în șoarecii transgenici deficienți în CXCR4

A. Introducere și obiective

B. Materiale și metode

C. Rezultate

i/ Caracterizarea infarctului de miocard la șoarecii transgenici deficienți în CXCR4

ii/ Analiza funcției cardiace post-infarct la șoarecii transgenici deficienți în CXCR4

iii/ Efectul negativ al CXCR4 de la nivelul celulelor medulare asupra funcției cardiace post-infarct

iv/ Rolul benefic al CXCR4 în mobilizarea și funcționalitatea EPC timpurii

v/ Evaluarea apoptozei în miocardul infarctizat la șoarecii transgenici deficienți în CXCR4

vi/ Particularitățile ultrastructurale ale miocardului la șoarecii transgenici deficienți în CXCR4

vii/ Proprietățile cardioprotectoare ale fosfatidil-serinei izolate din miocardul șoarecilor deficienți la CXCR4

D. Discuții și concluzii

CONCLUZII GENERALE

BIBLIOGRAFIE

DISEMINAREA REZULTATELOR OBȚINUTE ÎN CADRUL TEZEI DE DOCTORAT

FINANȚAREA CERCETĂRILOR

CUVINTE CHEIE

Neovascularizare
Boli cardio-vasculare
Infarct de miocard
Ischemie
Hipoxie
Angiogeneza
Celule endoteliale
Celule stem
Celule endoteliale progenitoare
Celule stem mezenchimale
Paracrin
VEGF
SDF-1
Chemotaxie
Cardioprotectie.

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

În contextul actual în care bolile cardiovasculare reprezinta principala cauză de mortalitate, elucidarea mecanismelor care stau la baza procesului de formare de noi vase de sânge la adult (neovascularizare), preocupă intens comunitatea științifică. Deși numeroase studii experimentale și trialuri clinice care urmăresc utilizarea celulelor stem/progenitoare pentru inducerea angiogenezei și a miogenezei au indicat rezultate încurajatoare (Gersh et al., 2009; Heil and Schaper, 2004; Lipinski et al., 2007; Mitsos et al., 2012), mecanismele prin care populațiile individuale de celule stem/progenitoare contribuie la îmbunătățirea funcției cardiace post-infarct sunt încă incomplet înțelese (Gersh et al., 2009). O mai bună înțelegere a acestora ar putea crește eficiența terapiilor celulare. De asemenea, având în vedere mediul ischemic în care celulele stem ajung după transplantarea în miocardul infarctizat, la fel de importantă este și înțelegerea proprietăților paracrine ale celulelor stem în condiții hipoxice.

Aceasta ar permite imaginarea unor strategii terapeutice adaptate fiecărui pacient, care să depășească posibilele impedimente determinate de particularitățile patologice. Optimizarea strategiei s-ar putea face prin alegerea celei mai potrivite populații celulare sau a unor combinații de populații sau prin utilizarea doar a factorilor secretați de acestea, cât și prin alegerea căii de administrare și a momentului în raport cu producerea accidentului vascular acut. De asemenea, celulele ce vor fi injectate pot fi precondiționate prin stimularea cu diverse citokine sau prin blocarea ori supraexprimarea unor receptori (Herrmann et al., 2011; Richardson et al., 2013).

În acest context, lucrarea de față evidențiază populațiile de celule stem/progenitoare care prezintă potențial angio-/vasculogen și câteva dintre mecanismele prin care ele contribuie la neovascularizarea țesuturilor ischemice. Mai departe, țintind în primul rând îmbunătățirea funcției miocardului infarctizat, sunt urmărite nu doar efectele benefice ale acestor tipuri celulare asupra neovascularizării, dar și asupra protecției oferite miocitelor cardiace expuse la stresul hipoxic. De asemenea, studiile investighează care este contribuția diverșilor factori paracrini la potențialul terapeutic al celulelor stem/progenitoare și dacă hipoxia modifică expresia acestora sau proprietățile paracrine ale celulelor. În ultima parte este evaluată contribuția axei SDF-1/CXCR4 la rolul paracrin al celulelor progenitoare și funcția CXCR4 în remodelarea cardiacă după infarctul de miocard (IM).

Teza este structurată în două parți cuprinzând 143 figuri, dintre care 105 figuri în partea a doua, 7 tabele (în partea a doua), 290 de referințe bibliografice și se extinde pe parcursul a 233 pagini.

În prima parte, Stadiul actual al cunoștințelor, organizată în 6 capitole, sunt prezentate mai întâi posibilitățile terapeutice existente, fiind evidențiată necesitatea dezvoltării unor noi strategii terapeutice (**Capitolul I.1.**). Apoi, după o scurtă descriere a structurii vaselor de sânge (**Capitolul I.2.**), se face o incursiune în mecanismele fiziologice ale neovascularizării (**Capitolul I.3.**), fiind inițial definiți termenii de vasculo-, angio- și arteriogeneză. Etapele procesului de angiogeneză (reorganizarea membranei bazale, a matricei extracelulare, a citoscheletului în timpul migrarii celulelor endoteliale (CE), maturarea si stabilizarea vasului) sunt descrise în detaliu. În cel de-al patrulea capitol (**Capitolul I.4.**), sunt descrise câteva modele pe care poate fi studiată experimental formarea vaselor, iar în penultimul capitol (**Capitolul I.5.**) sunt prezentați factorii cheie care modulează neovascularizarea. Ultimul

capitol (**Capitolul I.6.**) este dedicat descrierii diverselor strategii prin care poate fi indusă neovascularizarea, fiind întâi trecute în revistă principalele tipuri de celule stem și proprietățile lor generale, fiind apoi detaliate caracteristicile a două tipuri de celule cu rol în neovascularizare: celulele endoteliale progenitoare (EPC) și celulele stem mezenchimale (MSC). În final este sintetizată situația actuală a studiilor experimentale și clinice, fiind descrise succesele și limitările acestora.

În a doua parte a lucrării, cea de Contribuții originale, studiile au fost organizate în șase capitole. Studiile inițiale s-au concentrat pe identificarea potențialului endotelial al unor populații de celule stem/progenitoare (**Capitolul II.1.**). Rezultatele arată că din sursele tisulare, adulte și fetale, utilizate (sânge periferic, sânge din cordonul ombilical, gelatina Wharton și măduva osoasă) pot fi obținute cele 2 tipuri de EPC descrise în literatură (timpurii și târzii) și celule stem/progenitoare de tip mezenchimal. Potențialul endotelial al acestora din urmă este redus, însă fenotipul secretor a sugerat urmărirea în continuare a proprietăților paracrine ale acestora, în scopul stimulării neovascularizării.

Numeroase studii susțin contribuția EPC timpurii și târzii la neovascularizare prin mecanisme separate, cele timpurii având rol paracrin, în timp ce EPC târzii, cu potențial proliferativ crescut, având capacitatea de a se încorpora în vasele în formare (Asahara et al., 1997; Hur et al., 2004; Sieveking et al., 2008). De asemenea, este recunoscut faptul că formarea de noi vase poate fi modulată prin utilizarea unor combinații de factori angiogenici, procesul putând fi amplificat atunci când acești factori sunt administrați / eliberați secvențial (Freeman and Cohen, 2009; Hao et al., 2007). Pe de altă parte, un studiu care a analizat efectul administrării concomitente a EPC timpurii cu cele târzii asupra neovascularizării, pe un model *in vivo* de ischemie femurală, a arătat că cele două tipuri celulare au efect sinergic (Yoon et al., 2005). Toate aceste date nasc întrebarea dacă efectul benefic obținut este dependent de factorii eliberați de EPC timpurii, ca urmare a unui răspuns dinamic al acestor celule la condițiile întâlnite *in vivo*. Pentru a răspunde la această întrebare, utilizând două modele *in vivo*, am urmărit dacă factorii secretați *in vitro* de EPC timpurii pot îmbunătăți neovascularizarea indusă de EPC târzii (**Capitolul II.2.**). Rezultatele obținute arată că, în prezența factorilor secretați de EPC timpurii *in vitro*, EPC târzii incluse într-un fragment de Matrigel, transplantat subcutanat la șoarece, se pot organiza în structuri vasculare ce fuzionează cu rețeaua vasculară a organismului gazdă. De asemenea, transplantarea EPC târzii, în prezența factorilor secretați de EPC timpurii, în

mușchiul ischemic, crește semnificativ perfuzia tisulară, efect care nu este obținut la un nivel similar și atunci când EPC târzii sau factorii secretați de EPC timpurii sunt administrați separat. Astfel, se poate concluziona că factorii eliberați *in vitro* de către EPC timpurii sunt capabili să stimuleze semnificativ formarea de noi vase de către EPC târzii, nefiind necesară administrarea EPC timpurii pentru obținerea acestui efect.

Identificarea factorilor din mediul condiționat, responsabili de efectul benefic, va permite formularea unui compus terapeutic care să poate fi produs la scară largă și să poată fi administrat, la un situs ischemic, împreună cu EPC târzii, în scopul îmbunătățirii perfuziei tisulare. Astfel, pornind de la rezultatele studiilor *in vivo*, am urmărit în continuare descrierea factorilor paracrini responsabili pentru efectul benefic al EPC timpurii (**Capitolul II.3.**). De asemenea, am urmărit și influența hipoxiei asupra proprietăților secretorii ale EPC timpurii și a capacității angiogene și cardioprotectoare a factorilor eliberați de EPC timpurii în condiții normoxice și hipoxice. Prin realizarea profilului citokinic al EPC timpurii se poate spune că acestea secretă numeroși factori pro-angiogeni (VEGF, SDF-1, PlGF, Ang2, ET-1, IL-8, MCP-1, MMP10), dar și factori anti-angiogeni (TIMP-1, CXCL4), EPC timpurii putând astfel contribui la menținerea unei balanțe angiogene, care ar putea preveni angiogeneza patologică. Am arătat de asemenea că, deși hipoxia modulează profilul secretor al EPC timpurii, putându-se remarca, în ansamblu, creșterea secreției factorilor implicați în angiogeneză, inclusiv a VEGF, aceste modificări nu influențează semnificativ efectul angiogen al mediului condiționat. Astfel, se remarcă faptul că factorii eliberați de EPC timpurii, atât în condiții normale, cât și în condițiile deprivării de oxigen, induc proliferarea și migrarea CE, organizarea CE în cordoane și protejează miocitele cardiace de apoptoza indusă de hipoxie. A fost investigată, de asemenea, contribuția VEGF la proprietățile paracrine angiogene ale EPC timpurii. Rezultatele au arătat că prezența VEGF în mediul condiționat de la EPC timpurii nu este esențială pentru migrarea CE sau pentru formarea cordoanelor de CE pe Matrigel.

În continuare, au fost investigate proprietățile paracrine ale celulelor stem mezenchimale (MSC), urmărind capacitatea lor de a induce aderarea și proliferarea CE și de a proteja miocitele cardiace de apoptoza indusă de hipoxie (**Capitolul II.4.**). De asemenea, potențialul acestora a fost comparat cu cel al EPC timpurii și a fost evaluat și în condiții hipoxice. Rezultatele au arătat că factorii secretați de MSC stimulează chemotaxia și aderarea CE, dar nu sunt capabili să inducă proliferarea CE; de asemenea, au efecte

benefice asupra miocitelor cardiace ischemice. Activitatea secretorie a MSC este ușor modificată ca urmare a expunerii la hipoxie, dar aceste modificări nu influențează în mod evident efectele lor paracrine. Efectele induse de EPC timpurii *in vitro* sunt complementare celor induse de MSC, stimulând proliferarea, dar nu și aderarea CE. Ambele efecte pot fi induse simultan prin combinarea celor două medii condiționate, ceea ce arată că factorii eliberați de fiecare dintre cele 2 tipuri celulare nu sunt suficienți pentru a desăvârși angiogeneza. Aceasta sugerează că prin combinarea acestor două populații celulare sau a factorilor secretați de ele, angiogeneza ar putea fi indusă cu succes.

Procesul de neovasculogeneză este dependent de activitatea a diverse citokine, precum VEGF, bFGF, angiopoietinele și SDF-1 (Parsons-Wingerter et al., 2000; Visconti et al., 2002). Mecanismele prin care acestea orchestrează neovascularizarea sunt încă disputate. Se cunoaște faptul că la un situs ischemic se formează un gradient de SDF-1 care determină mobilizarea din măduvă a celulelor care exprimă CXCR4 și faptul că interacțiunea ligandului cu receptorul declanșează cascade de semnalizare implicate în creșterea, proliferarea și supraviețuirea celulară (Ganju et al., 1998; Petit et al., 2007; Roland et al., 2003). În acest context am urmărit în continuare profilul expresiei SDF-1 al EPC timpurii și am investigat dacă rolul paracrin al acestor celule la neovasculogeneză este mediat prin SDF-1 (**Capitolul II.5.**). De asemenea, având în vedere că interacțiunea SDF-1/CXCR4 este exploatată din ce în ce mai mult în vederea terapiei cu celule stem după IM (Zhang et al., 2007), ne-am propus să studiem funcția CXCR4 în remodelarea cardiacă după IM la șoareci modificați genetic ($CXCR4^{+/-}$), în scopul identificării unor eventuale efecte nedorite pe care le pot avea compușii farmacologici (**Capitolul II.6.**). Rezultatele obținute au arătat că EPC timpurii secretă cantități crescute de SDF-1 și sunt capabile să lege SDF-1 de suprafața lor, creând astfel un gradient local care poate atrage din circulație celule stem/progenitoare $CXCR4^{+}$ cu potențial angio-/vasculogen. Pe de altă parte, studiile in vivo pe șoarecii transgenici demonstrează că CXCR4 prezintă un efect de sabie cu două tăișuri asupra remodelării miocardului după IM. Astfel, pe de-o parte, șoarecii $CXCR4^{+/-}$ au prezentat după IM cicatrici mai mici și mai stabile, aceasta asociindu-se cu un răspuns monocitar mai degrabă regenerator și o mai bună adaptare a miocitelor cardiace la stresul hipoxic. Pe de altă parte, acest lucru a fost balansat prin afectarea funcției EPC timpurii, reducerea neovascularizării miocardului și diminuarea refacerii fluxului coronarian, acestea fiind împreună responsabile pentru lipsa de îmbunătățire a funcției ventriculare. Astfel,

extrapolarea acestor rezultate pentru inhibarea CXCR4 în sistem uman trebuie să se facă cu precauție.

În concluzie, datele cuprinse in aceasta teza demonstrează că:

- EPC timpurii și târzii pot fi obținute din sânge periferic și din sânge din cordon ombilical

- Potențialul endotelial al celulor stem/progenitoare de tip mezenchimal este limitat, însă acest tip celular poate fi exploatat în scopul stimulării neovascularizării pe baza proprietăților paracrine

- Factorii eliberați *in vitro* de către EPC timpurii sunt capabili să stimuleze semnificativ formarea de noi vase de către EPC târzii, nefiind necesară transplantarea EPC timpurii pentru obținerea acestui efect.

- EPC timpurii își mențin proprietățile paracrine în hipoxie și VEGF nu este esențial pentru efectul angiogen al acestora.

- Factorii paracrini secretați de MSC suportă o parte dintre procesele implicate în angiogeneză (susțin chemotaxia și aderarea CE, dar nu și proliferarea) și au efecte benefice asupra miocitelor cardiace ischemice; aceste proprietăți se mențin și atunci când MSC sunt supuse hipoxiei.

- Efectele induse de EPC timpurii *in vitro* sunt complementare celor induse de MSC, stimulând proliferarea, dar nu și aderarea CE. Ambele efecte pot fi induse simultan prin combinarea celor două medii condiționate (obținute de la EPC și MSC). Astfel, combinarea acestor două populații celulare sau a factorilor secretați de ele, ar putea constitui o strategie terapeutică de succes pentru inducerea angiogenezei.

- EPC timpurii secretă cantități crescute de SDF-1 și sunt capabile să lege SDF-1 de suprafața lor, creând astfel un gradient local care poate atrage din circulație, la un situs ischemic, celule stem/progenitoare $CXCR4^+$ cu potențial angio-/vasculogen.

- CXCR4 prezintă un efect de sabie cu două tăișuri asupra remodelării miocardului după IM, expresia lui scăzută determinând formarea unei cicatrici mai mici și mai stabile, dar afectând neovascularizarea miocardului și refacerea funcției ventriculare.

Reperele stabilite pe baza rezultatelor originale obținute pe parcursul stagiului doctoral permit imaginarea unor strategii care să optimizeze terapiile de vascularizare a unui teritoriu ischemic. Aceste date de natură preclinică urmează a fi întărite în viitor de studii clinice.

Bibliografie

1. Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J.M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science *275*, 964-967.
2. Freeman, I., and Cohen, S. (2009). The influence of the sequential delivery of angiogenic factors from affinity-binding alginate scaffolds on vascularization. Biomaterials *30*, 2122-2131.
3. Ganju, R.K., Brubaker, S.A., Meyer, J., Dutt, P., Yang, Y., Qin, S., Newman, W., and Groopman, J.E. (1998). The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. The Journal of Biological Chemistry *273*, 23169-23175.
4. Gersh, B.J., Simari, R.D., Behfar, A., Terzic, C.M., and Terzic, A. (2009). Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective. Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic *84*, 876-892.
5. Hao, X., Silva, E.A., Mansson-Broberg, A., Grinnemo, K.H., Siddiqui, A.J., Dellgren, G., Wardell, E., Brodin, L.A., Mooney, D.J., and Sylven, C. (2007). Angiogenic effects of sequential release of VEGF-A165 and PDGF-BB with alginate hydrogels after myocardial infarction. Cardiovascular Research *75*, 178-185.
6. Heil, M., and Schaper, W. (2004). Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). Circulation Research *95*, 449-458.
7. Herrmann, J.L., Abarbanell, A.M., Weil, B.R., Manukyan, M.C., Poynter, J.A., Brewster, B.J., Wang, Y., and Meldrum, D.R. (2011). Optimizing stem cell function for the treatment of ischemic heart disease. The Journal of Surgical Research *166*, 138-145.
8. Hur, J., Yoon, C.H., Kim, H.S., Choi, J.H., Kang, H.J., Hwang, K.K., Oh, B.H., Lee, M.M., and Park, Y.B. (2004). Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *24*, 288-293.
9. Lipinski, M.J., Biondi-Zoccai, G.G., Abbate, A., Khianey, R., Sheiban, I., Bartunek, J., Vanderheyden, M., Kim, H.S., Kang, H.J., Strauer, B.E., *et al.* (2007). Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. J Am Coll Cardiol *50*, 1761-1767.
10. Mitsos, S., Katsanos, K., Koletsis, E., Kagadis, G.C., Anastasiou, N., Diamantopoulos, A., Karnabatidis, D., and Dougenis, D. (2012). Therapeutic angiogenesis for myocardial ischemia revisited: basic biological concepts and focus on latest clinical trials. Angiogenesis *15*, 1-22.
11. Parsons-Wingerter, P., Elliott, K.E., Clark, J.I., and Farr, A.G. (2000). Fibroblast growth factor-2 selectively stimulates angiogenesis of small vessels in arterial tree. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *20*, 1250-1256.
12. Petit, I., Jin, D., and Rafii, S. (2007). The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. Trends in Immunology *28*, 299-307.

13. Richardson, J.D., Nelson, A.J., Zannettino, A.C., Gronthos, S., Worthley, S.G., and Psaltis, P.J. (2013). Optimization of the cardiovascular therapeutic properties of mesenchymal stromal/stem cells-taking the next step. Stem Cell Reviews *9*, 281-302.
14. Roland, J., Murphy, B.J., Ahr, B., Robert-Hebmann, V., Delauzun, V., Nye, K.E., Devaux, C., and Biard-Piechaczyk, M. (2003). Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. Blood *101*, 399-406.
15. Sieveking, D.P., Buckle, A., Celermajer, D.S., and Ng, M.K. (2008). Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay. J Am Coll Cardiol *51*, 660-668.
16. Visconti, R.P., Richardson, C.D., and Sato, T.N. (2002). Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 8219-8224.
17. Zhang, M., Mal, N., Kiedrowski, M., Chacko, M., Askari, A.T., Popovic, Z.B., Koc, O.N., and Penn, M.S. (2007). SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *21*, 3197-3207.

ROMANIAN ACADEMY
INSTITUTE OF CELLULAR BIOLOGY AND PATHOLOGY
"NICOLAE SIMIONESCU"

PhD THESIS
-BOOK SUMMARY-

The involvement of protein tyrosine phosphatases (PTPs) in intracellular signalling

Coordinator:
Acad. Maya Simionescu

PhD student:
Andreea Miruna Nemecz

Bucharest
-2012-

CONTENTS

Part I- The current stage of knowledge

I. Phosphatases, regulators of homeostasis

1. Definition, mechanism of action and classification
2. Protein phosphatases (PPs)-classification

II. Protein Tyrosine Phosphatases (PTPs)

1. PTPs classification
2. PTPs structure
3. PTPs genetic
4. PTPs substrate recognition and catalytic mechanism
5. PTPs regulation
   a. Proteolytic cleavage
   b. Phosphorylation
   c. Dimerization
   d. Oxidation
   e. Other post translational modifications(sumoilation, acetylation)
   f. Inhibition of PTPs enzyme activity/protein expression

III. PTPs and intracellular signalling

1. Localization and cellular substrates
2. Vascular PTPs – the role in vascular physiology and pathology
   A. PTPs in endothelial cells
      a. PTPs involved in angiogenesis
         - VEGFR and PTPs
         - Tie2 and PTPs
      b. PTPs involved in adhesion and motility
         - Integrins and PTPs
         - PECAM and PTPs
      c. PTPs involved in intracellular adhesion
         - Cadherins and PTPs
   B. PTPs in smooth muscle cells
      PTPs involved in angiogenesis
         - PDGFR and PTPs
         - AT and PTPs
         - NO and PTPs
3. The PTPs involvement in diabetes mellitus
4. The role of PTPs in other diseases

Part II - Original contributions

A. INTRODUCTION AND OBJECTIVES

B. METHODOLOGICAL CONSIDERATIONS

C. EXPERIMENTAL STUDIES

I. „*in vitro*" experimental model – smooth muscle cells in culture; The effects of oxidative stress, of insulin stimulation and inhibitors on smooth muscle cells from vascular wall: affected molecules

1. The effect of *high glucose, oxidative stress* and i*nsulin* on *:*

- ERK ½ controlled mitogenic pathway
- metabolic pathway controlled by activated Akt
- signalling pathway controlled by dephosphorylating **PTP-1B**

Results and discussions

2. The effect of *high glucose* and *PDGF-BB growth factor* on **PTP-1B** and molecules from insulin signalling pathway

Results and discussions

3. The modulation of protein expression and activity of the molecules from insulin signalling pathway (ERK ½ , Akt and **PTP-1B**) with the help of *oxidants/antioxidants and inhibitors*

a. The effect of *oxidants and inhibitors*
Results and discussions
b. The influence of *antioxidants on the oxidation* induced by high glucose concentration, as well as PDGF-BB growth factor
Results and discussions

II. „*in vivo*" experimental model –Golden Syrian hamsters with streptozotocin diabetes; Phosphorylation/Dephosphorylation events in aorta
Results and discussions

III. Obese and obese-associated Type II diabetes patients; Molecules from insulin signalling pathway
Results and discussions

D. General discussions

BIBLIOGRAPHY
LIST OF PUBLICATIONS

KEYWORDS

Phosphatases

Kinases

Dephoshorylation

Intracellular signalling

Protein tyrosine phosphatases

Negative regulators

Vascular pathology

Insulin

Diabetes

Homeostasis

Glycaemia

Phosphatases are group of enzymes that dephoshorylate by removing a phosphate group from its substrate. They catalyse the hydrolysis of phosphoric acid monoesters in a phosphate ion and molecule with a free hydroxyl group. This action is directly opposite to that of phophorylases and kinases, which attach phosphate groups to their substrates by using energetic molecules like ATP.

Together with kinases, phosphatases regulate the phophorylation state of the cell. The balance between events controlled by these enzymes has an important role in intracellular signalling.

Since protein kinases (PKs) frequently phophorylates proteins substrates on tyrosine, serine and threonine residues, protein phophatases (PPs) exert the reversible effect engaging usually the same amino acids in proteins.

Protein tyrosine phosphatases (PTPs) are enzyme that removes phosphate groups from tyrosine residues in different proteins. Protein phophorylation on tyrosine residues (pTyr) is a common post-translational modification that can create novel recognition motifs for protein interactions and cell localization, affect protein stability and regulate enzyme activity. They can also be a key regulatory components in signal transduction pathways and they are very important in the control of cell growth, proliferation and differentiation.

PTPs are critical regulators of signal transduction under normal and pathophysiological conditions. These proteins exert a regulatory effect on signalling transduction at different levels by dephosphorylation of membrane receptors like protein tyrosine kinases (PTKs) and ionic channels. They can modulate signalling cascades by dephosphorylation of adaptor molecules, intracellular kinases and transcription factors. PTKs have been identified as targets for PTPs. Many PTPs dephosphorylates more than a PTK, and almost each PTK is dephosphorylated by more than a PTP.

Depending on substrate specificity, vascular PTPs contributes to vascular pathology. PTPs are critical regulators of tyrosine phosphorylation-dependent signalling events and may represent novel targets for therapeutic intervention in a variety of human diseases. PTPs are negative regulators of cell proliferation and mitogenic signalling cascades of Ang II, insulin, IGF-1, EGF and PDGF in several cell types, including vascular smooth muscle cells (VSMCs) (Marrero, 2004).

Because a critical regulatory step in insulin signal transduction is the dephosphorylation of signalling molecules by PTPs, it is plausible that enhanced activity of one or more PTPs could lead to insulin resistance (Choi et al., 2010).

The first part of my work „**The current state of knowledge**” presents PTPs throughout three chapters.

The first chapter presents classification and catalytic mechanism of phophatases. The balance between reactions exerted by phophatases and the one carried out by kinases seems to

be of the great importance in intracellular signalling. Phosphatases play a crucial role in homeostasis.

The second chapter describes PTPs classification and structure. Also, reveals some aspects regarding the substrate recognition and PTPs mechanism of action, as well as the main regulation processes for the action of PTPs.

In the last chapter it is shown the localisation of PTPs and their substrate molecules. This part of my work presents vascular wall-localised PTPs. Depending on cell type localisation, vascular PTPs regulate processes like angiogenesis, cell adhesion and motility. PTPs control signalling pathways involving growth factors and adhesion molecules. In this way PTPs have crucial role in vascular physiology and pathology. In the same chapter are presented PTPs that regulates insulin receptor signalling pathway. These enzymes play a substantial role in insulin signalling by reducing signalling and insulin receptor dephosphorylation. Along with diabetes mellitus there are also described some other pathologies in which PTPs play central roles. For PTPs activity, it is considerable the oxidation state of the enzymes, as well as the processes of oxidation/antioxidation developed at this level.

Our research, focused on finding new methods for PTPs activity manipulation, by using inhibitors and effects of oxidants/antioxidants on key molecules from insulin signalling pathway. Therefore in the second part of my work ''**Original contributions**", there have been two major objectives:

1. Analysing the hyperglycaemia-induced changes in PTP-1B protein level as well as in protein level of the kinases involved in insulin signalling pathway. ***(chapter I, II si III)***

1a.The hydrogen peroxide and insulin action consequences.

1b. The effects of growth factor PDGF-BB stimulation.

Experimental models:

- „*in vitro*", smooth muscle cells isolated from human aorta, cell line
- „*in vivo*", streptozotocin injected Golden Syrian hamsters
- human biological material, from obese and obese-associated Type II diabetic patients

2. Investigation of mechanisms by which oxidants/antioxidants and inhibitors act on PTP-1B and signalling kinases from insulin pathway ***(chapter I)***

2a. The role of high glucose (HG) and sodium orthovanadate.

2b. Modulation of molecules expression in hyperglycaemic conditions and PDGF-BB stimulation after catalase and superoxid dismutase action.

Model experimental:

- „*in vitro*", smooth muscle cells isolated from human aorta, cell line

GENERAL DISCUSSIONS:

Apprehending signalling pathways as well as molecules involved in vascular wall cell signalling, are critical for a better understanding of diabetes-associated endothelial dysfunctions.

In order to understand PTPs pathophysiology, structure and enzyme activity the studies conducted pursued two main objectives:

1. Protein level changes of the molecules from insulin signalling pathway induced by high glucose associated with growth factors and antioxidants stimulation ***(chapter I, II and III).***
2. The mechanisms by which antioxidants and inhibitors act on the molecules from insulin signalling pathway, reestablishing physiological function ***(chapter I).***

„Original contributions" results presented over three chapters:

1. High glucose, oxidative stress and insulin induce imbalance of insulin signalling molecules phosphorylation in SMCs. Hyperglycaemia determinates over expression of molecules (excepting activated Akt); oxidative stress has the same effect (less on PTP-1B); while insulin exerted antagonic effects on both molecules;

The originality of the study: ***I demonstrated that overexposure of SMCs to HG has a strong activating effect on Akt. ERK ½ was sensible to H_2O_2 , but not responsive to insulin action. Long-term exposure of SMCs to an even higher glucose concentration (i.e. 30 mM) leads to the occurrence of an additional band reactive with the PTP-1B antibody, of apparent molecular mass slightly higher than 51 kDa.***

2. Stimulation of SMCs with PDGF-BB determines an over expression of insulin signalling molecules. While PTP-1B protein expression is increased by PDGF-BB stimulation in a dose-dependent manner, pAkt and pERK ½ achieve a maximum value at 2 ng/ml.

The originality of the study consists of: ***stimulation with PDGF-BB of SMCs grown in high glucose, amplifies the PDGF-BB effect on insulin signalling molecules***.

3. Maintenance of SMCs in high glucose as well as in acute H_2O_2 stimulation, cause a diminished PTP activity duet to oxidation. $NaVO_4$, the PTPs nonspecific inhibitor, induces decrease of PTP-1B protein expression followed by molecular modification of pAkt and pERK ½.

The originality of the study : ***I established that part of endogenous oxidation (i.e. HG) and exogenous one (i.e. H_2O_2) responsible of PTPs reduced activation are reversible. In***

hyperglycaemia, some PTP-1B enzyme oxidations are also reversible, capable of influencing catalytic activity of this phosphatase and regulation of insulin signalling pathway. In high glucose conditions, $NaVO_4$ leads to PTP-1B down regulation in SMCs.

4. Overexposure of key molecules from insulin signalling pathway, following prolonged culture of SMCs in hyperglycaemic oxidant conditions, can be reversed by antioxidants. Catalase and superoxide dismutase are also able to re-establish protein levels of these molecules, increased due to oxidations as a consequence of PDGF-BB stimulation.

The originality of the study consists of: ***both antioxidants exercise strong effect on HG and PDGF-BB alone induced-oxidations, but especially on hyperglycaemia and PDGF-BB cumulative induced-oxidations.***

5. In streptozotocin injected Golden Syrian hamsters, diabetic hyperglycaemia imbalance the expression of phosphatases (i.e. PTP-1B) vs. kinases (i.e. PI_3K and activated Akt) in the insulin signalling pathway. This disequilibrium is associated with endothelial pronounced permeability and SMCs apoptosis, and can also underline the aortic wall dysfunction as consequence of many changes in these cells.

The originality of the study consists of: ***demonstration of circulating hyperglycaemia effects on the balance between kinases / PTP-1B that acts in aortic wall, in the case of Type I diabetes.***

6. Obesity, as well as obesity associated with Type II diabetes influence protein expression of molecules associated with insulin signalling. In arterioles from subcutaneous adipose tissue, obesity induces a down regulation of insulin signalling molecules. This process is slowed in the case of obesity associated with Type II diabetes

The originality of the study consists of: ***I concluded that in both obese patients and obese associated with Type II diabetes patients, the arterioles from subcutaneous adipose tissue showed changes in expression of insulin signalling molecules important in both diseases***.

The imbalance in hyperglycaemia-induced phosphorylation/dephosphorylation events are accompanied by multiple reversible and irreversible oxidations which can interfere in diabetes -associated vascular dysfunction of aortic wall. Using PTPs antioxidants as well as the inhibitors could reverse changes occurred in smooth muscle cells or endothelial cells and that may improve vascular function. Therefore considering PTPs therapeutic targets would bring new elements in cardiovascular pathophysiology.

BIBLIOGRAPHY:

1. Marrero, M.B. Introduction to JAK/STAT signaling and the vasculature. *Vascul Pharmacol*. 2005; **43**: 307–309

2. Choi, K. And Kim, Y.-B., Molecular Mechanism of insulin Resistance in Obesity and type 2 Diabetes. *Korean J Intern Med*. 2010; **25**: 119-129

LIST OF PUBLICATIONS:

Articles published in ISI indexed journals with impact factor

1. Popov Doina, **Nemecz Miruna**, Dumitrescu Madalina, Georgescu Adriana, Böhmer Frank D. Long-term high glucose concentration influences Akt, ERK1/2, and PTP1B protein expression in human aortic smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 388(1):51-55, 2009 (IF: 2.64)

2. Adriana Georgescu, Doina Popov, Anamaria Constantin, **Miruna Nemecz**, Nicoleta Alexandru, Daniel Cochior, Aura Tudor. Dysfunction of human subcutaneous fat arterioles in obesity alone or obesity associated with Type 2 diabetes. *Clinical Science,* 120(10): 463-472; 2011 (IF: 4.2)- premiat in 2011

3. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, **Miruna Nemecz,** Irina Titorencu, Doina Popov. Enoxaparin reduces adrenergic contraction of resistance arterioles in aging and in aging associated with diabetes via engagement of MAP kinase pathway. *Blood Coagulation and Fibrinolysis,* 22(4): 310:316, 2011 (IF: 1.4)-premiat in 2011

Articles published in journals indexed for the international database

Miruna Nemecz, Doina Popov, Adriana Georgescu. Phosphorylation/dephosphorylation signaling events in the aorta of streptozotocin-injected Golden Syrian Hamsters. Annals of RSCB, vol XV, issue 1, 28-34, 2010, edited by A. Ardelean et. al. (indexat CNCSIS B+)

The abstracts presented at international meetings

1. Microparticles as potential markers in venous insufficiency.A. Georgescu, N. Alexandru, H. Maniu, **M. Nemecz**, D. Popov *in Book of Abstracts , at Romanian Society for Cell Biology at 25 years-Aniversary Workshop:"From Basic Science to Terapeutic Applications"*. p.4, 2007, Bucharest, Romania

2. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Manuela Amuzescu, **Miruna Nemecz,** Constantin Zamfir, Horia Maniu, Adrian Badila. Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles, in *Journal of Vascular Research, vol. 45, supplements 2*, p.146, at *"25th Conference of the European Society for Microcirculation: Integrating Vascular Biology & Medicine Basic and Clinical Science"*,August 26-29, 2008, Budapest, Hungary

3. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Manuela Amuzescu, **Miruna Nemecz,** Eugen Andrei, Constantin Zamfir, Horia Maniu, Adrian Badila, Maya Simionescu. Elevated level of circulating microparticles in chronic venous insufficiency. *in Book of Abstracts*, p. 31, at Biomedicine Workshop"*From fundamental research to therapeutic applications", "Conference, Diaspora in Romanian Sciences Research",* September 17-18, 2008, Bucharest, Romania

4. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Manuela Amuzescu, **Miruna Nemecz,** Constantin Zamfir, Horia Maniu, Adrian Badila. Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles. *Journal of Clinical Lipidology*, vol. 2, no. 5S, p. 64-67- *at 7th International Symposium on "MULTIPLE RISK FACTORS IN CARDIOVASCULAR DISEASES – Prevention and Intervention – Heath Policy"*, October 22-25, 2008, Venice, Italy

5. M. Nemecz, A. Georgescu**,** D. Popov. Protein Tyrosine Phosphatase 1B expression in the smooth muscle cells in aorta in hyperglycemia conditions, at "Biomedicine Workshop, *From fundamental research to therapeutic applications", "Conference, Diaspora in Romanian Sciences Research",* September 17-18, 2008, Bucharest, Romania

6. A. Georgescu**,** N. Alexandru, D. Popov, M. Amuzescu, E. Andrei, **M. Nemecz**, C. Zamfir, A. Badila, M. Simionescu. Elevation of endothelial and platelet microparticles in patients with chronic venous insufficiency, at *XXII Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis* , July 11-16, 2009, Boston , USA

7. L-D. Popov, **M. Nemecz**, M. Dumitrescu, A. Georgescu**,** F. D. Böhmer .Long time culture of human aortic smooth muscle cells in high glucose concentration up-regulates ERK1/2 activation and PTP1B protein expression, at *45th EASD Annual Meeting,* Vienna, Austria, 29.09.2009-02.10.2009, published in *Diabetologia*, 52, Suppl. 1, p.S515, no. 1336, 2009

8. Miruna Nemecz, Adriana Georgescu, Doina Popov. Influence of antioxidants on human vascular smooth muscle cells grown in high glucose, in *Bulletin of Romanian Society for Cell Biology*, p. 91, no.39, at The *3rd International Congress and 29th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology*, June 8-12, 2011, Arad-Szeged, Romania-Hungary

9. Miruna Nemecz, Adriana Georgescu, Doina Popov. The effect of antioxidants on high glucose and platelet derived growth factor stimulated human vascular smooth muscle cells. *'Inflammation and Cardiovascular Disease" Summer School*, Obergurgl, Austria, September 29 - October 2, 2011

10. Adriana Georgescu**, Miruna Nemecz**, Nicoleta Alexandru, Aura Tudor, Daniel Cochior, Doina Popov**.** Dysfunction of Human Subcutaneous Fat Arterioles in Obesity Alone or Obesity Associated with Type 2 Diabetes, *at '4th Annual Meeting of the Diabetes and Cardiovascular Disease EASD Study Group',* October 27–29, 2011, Munich, Germany, Book of Abstracts, p.37.

11. M. Nemecz, A. Georgescu**,** D. Popov, M. Simionescu. Influence of catalase and superoxide dismutase on human vascular smooth muscle cells grown in high glucose. at *'4th Annual Meeting of the Diabetes and Cardiovascular Disease EASD Study Group',* October 27-29, 2011, Munich, Germany, Book of Abstracts, p.33

The abstracts presented at national meetings

1. A. Georgescu**,** N. Alexandru, M. Amuzescu, **M. Nemecz**, C. Zamfir, H. Maniu, A. Badila, D. Popov. Insuficienta venoasa cronica este asociata cu un nivel crescut de microparticule circulante/ Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles, *in Buletinul SNBC/ in Bulletin of Romanian Society for Cell Biology* , pag . 50/p. 50, nr.36/no.36, *la a XXVI-A Sesiune Stiintifica Anuala a Societatii Nationale de Biologie Celulara/ at The 26th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology ,* 12-15 iunie 2008/ June 12-15, 2008, Cluj-Napoca, Romania

2. Miruna Nemecz, Adriana Georgescu**,** Doina Popov. Expresia protein tirozin fosfatazei 1B in celulele musculare netede si aorta in conditii de glucoza crescuta/The expression of protein tyrosine phosphatase 1B in smooth muscle cells and aorta in hyperglycemia conditions, *in Buletinul SNBC/ in Bulletin of Romanian Society for Cell Biology* , pag . 52/p.52, nr.36/no.36, la a *XXVI-A Sesiune Stiintifica Anuala a Societatii Nationale de Biologie Celulara/ at The 26th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology,* 12- 15 iunie/June 12-15, 2008, Cluj-Napoca, Romania

ACADEMIA ROMANA
INSTITUTUL DE BIOLOGIE SI PATOLOGIE CELULARA
"NICOLAE SIMIONESCU"

TEZA DE DOCTORAT
REZUMAT

Implicarea protein tirozin fosfatazelor (PTP) in semnalizarea intracelulara

Conducator stiintific:
Academician Maya Simionescu

Doctorand:
Andreea Miruna Nemecz

Bucuresti
-2012-

CUPRINS

Partea I- Stadiul actual al cunostintelor

I. Fosfatazele, reglatorii homeostaziei

1. Definitia, mecanismul de actiune si clasificarea
2. Protein fosfatazele (PPazele)-clasificarea

II. Protein Tirozin Fosfatazele (PTPazele)

1. Clasificarea PTPazelor
2. Structura PTPazelor
3. Genetica PTPazelor
4. Recunosterea substratului de catre PTPaze si mecanismul lor catalitic
5. Reglarea PTPazelor
   a. Clivajul proteolitic
   b. Fosforilarea
   c. Dimerizarea
   d. Oxidarea
   e. Alte modificari postranslationale (sumoilarea, acetilarea)
   f. Inhibarea activitatii/expresiei PTPazelor

III. PTPazele si semnalizarea intracelulara

1. Localizari si substrate celulare
2. PTPaze vasculare-rol in fiziologia si patologia vasculara

A. PTPazele in celulele endoteliale

a. PTPaze implicate in angiogeneza
   - VEGFR si PTPazele
   - Tie2 si PTPazele

b. PTPaze implicate in adeziune si motilitate
   - Integrinele si PTPazelor
   - PECAM si PTPazele

c. PTPaze implicate in adeziune intercelulara
   - Caderinele si PTPazele

B. PTPaze in celule musculare netede

PTPaze implicate in angiogeneza
   - PDGFR si PTPazele
   - AT si PTPazele
   - NO si PTPazele

3. Implicarea PTPazelor in diabetul zaharat
4. Rolul PTPazelor in alte patologii

Partea II - Contributii originale

A. INTRODUCERE SI OBIECTIVE

B. METODOLOGIE EXPERIMENTALA

C. STUDII EXPERIMENTALE

I. <u>Model experimental „*in vitro*”- celule musculare netede in cultura</u>; Efectele stresului oxidativ, al stimularii cu insulina si al inhibitorilor, asupra celulelor musculare netede din peretele vascular: molecule afectate

1. Efectul *glucozei crescute , stresului oxidativ si insulinei* asupra *:*

- caii mitogenice controlate de ERK ½
- caii metabolice controlate de activarea Akt
- caii de semnalizare controlata de **PTP-1B** defosforilanta

Rezultate si discutii

2. Efectul *glucozei crescute si a factorului de crestere PDGF-BB* asupra **PTP-1B** si moleculelor din calea de semnalizare a insulinei

Rezultate si discutii

3. Modularea expresiei si activitatii moleculelor din calea de semnalizare a insulinei (ERK ½ , Akt si **PTP-1B**) cu *ajutorul oxidantilor/antioxidantilor si inhibitorilor*

a. *Efectul oxidantilor si inhibitorilor*

Rezultate si discutii
b. Influenta *antioxidantilor asupra oxidarilor* produse de concentratia ridicata de glucoza, precum si de factorul de crestere PDGF-BB
Rezultate si discutii
II. Model experimental „*in vivo*”- hamsteri sirieni aurii cu diabet streptozotocinic; Procesele de fosforilare/defosforilare in aorta
Rezultate si discutii
III. Pacienti cu obezitate si diabet II; Molecule din calea de semnalizare a insulinei
Rezultate si discutii
D. Concluzii generale

BIBLIOGRAFIE
LISTA LUCRARILOR STIINTIFICE PUBLICATE SI COMUNICATE

CUVINTE CHEIE

Fosfataze

Kinaze

Defosforilare

Semnalizare intracelulara

Protein tirozin fosfatazele

Reglatori negativi

Patologie vasculara

Insulina

Diabet

Homeostazie

Glicemie

Fosfatazele sunt enzime care prin procesul de defosforilare, indeparteaza de la nivelul substratului o grupare fosfat, prin hidroliza monoesterilor acidului fosforic in ioni fosfat si molecule cu grupari hidroxil libere. Acest proces este opus procesului de fosforilare, catalizat de enzime numite kinaze, care ataseaza grupari fosfat la nivelul substratului utilizand moleculele energetice, precum ATP.

Ambele tipuri de enzime sunt responsabile de controlul starii de fosforilare a celulei, echilibrul dintre procesele reglate de acestea ocupand astfel un rol important in cadrul semnalizarii intracelulare.

Protein fosfatazele (PPazele) sunt fosfataze care defosforileaza exclusiv substraturi proteice, tinta lor reprezentand anumiti aminoacizi din structura unei proteinei. Cei mai intalniti aminoacizii defosforilati sunt: serina (Ser), treonina (Thr) si mai rar tirozina (Tyr), intrucat proteinele sunt predominant fosforilate de protein kinaze (PKaze) la gruparile acestor aminoacizi.

Protein tirozin fosfatazele (PTPazele) sunt enzime care inlatura grupuri de fosfat din cadrul resturilor de Tyr fosforilata ale diferitelor proteine. Fosforilarea proteinelor la aminoacidul Tyr (pTyr), este o modificare post-translationala obisnuita care formeaza noi motive de recunoastere pentru interactia proteinelor si localizarile celulare, aceasta modificare putand afecta stabilitatea proteinelor si regla activitatea enzimatica. Fosforilarea proteinelor la resturi de tirozina reprezinta un mecanism cheie pentru transmiterea semnalului si pentru reglarea unui spectru larg de procese fiziologice precum controlul greutatii, proliferarii si diferentierii celulare.

PTPazele sunt reglatori ai transmiterii semnalului, atat in conditii fiziologice, dar si patologice. Aceste proteine exercita un efect reglator asupra transmiterii de semnal la diferite nivele prin defosforilarea receptorilor de membrana cum ar fi PTKazele si canalele ionice. Ele pot modula cascada de semnalizarea prin defosforilarea moleculelor adaptor, kinazelor intracelulare si a factorilor de transcriere. PTKazele au fost identificate ca fiind tinte pentru PTPaze. O serie de PTPaze defosforileaza mai multe PTKaze, si aproape fiecare PTKaza este defosforilata de mai mult decat o PTPaza.

PTPazele exprimate in celulele vasculare in functie de specificitatea de substrat, contribuie la patologia vasculara. PTPazele sunt reglatori importanti ai etapelor semnalizarii dependente de fosforilarea tirozinica, devenind astfel noi tinte terapeutice intr-o serie de afectiuni patologice. PTPazele sunt reglatori negativi ai proliferarii celulare si ai numeroaselor cascade mitogenice: Ang II, INS, IGF-1, EGF, PDGF in numeroase tipuri celulare, printre care si celulele musculare netede vasculare (Marrero, 2004).

Intrucat un pas reglator important in transmiterea semnalului de-a lungul caii activate de insulina il reprezinta defosforilarea moleculelor de semnalizare de catre PTPaze, este destul de probabil ca amplificarea activitatii uneia sau a mai multor PTPaze sa conduca la rezistenta la insulina (Choi si colab., 2010).

.

In prima parte a tezei „ **Stadiul actual al cunostintelor”,** sunt prezentate pe parcursul a trei capitole diferite aspecte privind PTPazele

Capitolul I descrie fosfatazele, clasificarea si mecanismul lor de actiune. De asemenea este subliniata importanta echilibrului dintre procesele catalizate de fosfataze si cele catalizate de kinaze in cadrul semnalizarii intracelulare, fosfatazele avand un rol deosebit de important in homeostazie.

Capitolul al-II-lea prezinta PTPazele, clasificarea, structura si genetica acestora. Tot in acest capitol sunt prezentate aspecte privind recunosterea substratului si mecanismul de actiune al PTPazelor, dar si principalele procese prin care ele sunt reglate.

Capitolul al-III-lea descrie localizarea PTPazelor si moleculele substrat ale acestora, insistandu-se pe PTPazele localizate la nivelul peretelui vascular. In functie de tipul celular la nivelul caruia sunt localizate, PTPazele vasculare participa la procese precum angiogeneza, adeziunea si motilitatea celulara. Ele regleaza caile de semnalizare ale factorilor de crestere si moleculelor de adeziune, avand in acest fel un rol important in fiziologia si patologia vasculara. Tot in cadrul acestui capitol sunt prezentate PTPazele care intervin de-a lungul caii de semnalizare a receptorului la insulina, controlandu-i astfel activitatea. PTPazele atenueaza semnalizarea la insulina prin defosforilarea receptorului sau, avand astfel un rol important in calea de semnalizare a insulinei. Alaturi de diabetul zaharat, sunt prezentate aici si alte patologii in care PTPazele au rol de reglatori centrali. Se subliniaza importanta starii de oxidare a PTPazelor in activitatea lor intracelulara, precum si a proceselor oxidative/antioxidative desfasurate la acest nivel.

Cercetarile noastre s-au concentrat asupra identificarii unor noi metode de manipulare a activitatii PTPazelor, prin utilizare inhibitorilor si efectele oxidantilor/antioxidantilor asupra moleculelor cheie din calea de semnalizarea a insulinei. In acest sens, in cadrul partii a II-a a tezei ”**Contributii originale”,** am incercat sa urmaresc doua mari obiective:

1. Determinarea modificarilor inregistrate la nivelul PTP-1B si a kinazelor implicate in calea de semnalizare a insulinei in hiperglicemie ***(capitolul I, II si III)***

1a. Consecintele prezentei apei oxigenate si a insulinei.

1b. Efectele stimulante ale factorul de crestere PDGF-BB

Modele experimentale:

- *„in vitro”,* celule musculare netede izolate din aorta umana, linie celulara
- *„in vivo”,* hamsteri sirieni aurii injectati cu streptozotocina
- material biologic uman, provenit de la pacienti obezi si obezi cu diabet II

2. Investigarea mecanismelor prin care oxidantii/antioxidantii si inhibitorii actioneaza asupra PTP-1B si a kinazelor din calea de semnalizare a insulinei ***(capitolul I)***

2a. Rolul actiunii glucozei crescute si a ortovanadatului de Na.

2b. Modularea expresiei moleculelor in conditii de hiperglicemie si stimulare cu PDGF-BB sub actiunea catalazei si a superoxid dismutazei.

Model experimental:

- „in vitro", celule musculare netede izolate din aorta umana, linie celulara

CONCLUZII GENERALE:

Cunoasterea cailor si moleculelor de semnalizare ale celulelor peretelui vascular, sunt esentiale pentru intelegerea disfunctilor endoteliale asociate diabetului.

In contextul intelegerii patofiziologiei PTPazelor, structurii si activitatilor enzimatice, studiile realizate in aceasta teza de doctorat au urmarit 2 obiective majore:

1. modificarile inregistrate la nivelul moleculelor caii de semnalizare a insulinei in conditii de glucoza crescuta urmarind asocierea hiperglicemiei cu factorii de crestere si oxidanti ***(capitolul I,II si III).***

2. mecanismele prin care antioxidantii si inhibitorii actioneaza asupra moleculelor din calea de semnalizare a insulinei, restabilind functia fiziologica ***(capitolul I).***

Rezultatele originale obtinute si prezentate pe parcursul celor 3 capitole in partea de „Contributii originale", au dovedit ca:

1. Glucoza crescuta, stresul oxidativ si insulina, sunt factori care duc la un dezechilibru al moleculelor caii de semnalizare a insulinei la nivelul CMNV. Hiperglicemia determina supraexprimarea acestor molecule cu exceptia Akt activat; stresul oxidativ are acelasi efect, mai putin asupra PTP-1B; in timp ce insulina are efecte antagonice asupra celor doua molecule.

Originalitatea studiului: ***am aratat ca expunerea CMNV pe timp indelungat la HG, are un puternic efect activator asupra Akt. De asemenea, tot la nivelul CMNV, ERK ½ manifesta sensibilitate la H_2O_2, ramanand insa insensibil la actiunea insulinei. Expunerea prelungita a celulelor la o concentratie si mai mare de glucoza (ex. 30 mM) duce la aparitia unei a doua benzi situata desupra benzii de masa moleculara de 51 kDa.***

2. Stimularea CMNV cu PDGF-BB determina o supraexprimare a moleculelor din calea de semnalizare a insulinei. In timp ce expresia proteica a PTP-1B creste proportional cu concentratia de PDGF-BB utilizata, pAkt si pERK ½ ating un maxim la 2 ng/ml.

Originalitatea consta in: ***stimularea cu PDGF-BB a CMNV crescute in conditii de hiperglicemie, amplifica efectul avut de acesta asupra moleculelor din calea de semnalizare a insulinei***.

3. Cresterea CMNV in glucoza crescuta, precum si stimularea acestora cu H_2O_2 duce la o scadere a activitatii PTPazelor datorata oxidarilor produse. Inhibitorul nespecific al PTP-azelor, $NaVO_4$, determina scaderea expresiei proteice a PTP-1B, inhibitia acestei fosfataze determinand ulterior modificari ale expresiei pAkt, dar si pERK ½.

Originalitatea studiului : ***am demonstrat ca o parte din oxidarile endogene (HG) si exogene (H_2O_2) responsabile de scaderea activitatii PTPazelor sunt reversibile. De asemenea, in hiperglicemie, la nivelul enzimei PTP-1B se produc o serie de oxidari, o parte din ele reversibile, oxidari ce ar putea influenta activitatea catalitica a acestei fosfataze si implicit reglarea caii de semnalizare in care aceasta joaca un rol important. In conditii hiperglicemice, inhibitorul $NaVO_4$, scade expresia PTP-1B in CMNV.***

4. Supraexprimarea moleculelor cheie din calea de semnalizarea a insulinei, consecinta a expunerii CMNV conditiilor hiperglicemice oxidante, poate fi reversata cu ajutorul antioxidantilor. De asemenea, atat catalaza cat si SOD restabilesc nivelele proteice ale acestor moleculelor, amplificate in urma oxidarilor produse prin stimularea CMNV cu PDGF-BB.

Originalitatea consta in: ***cei doi antioxidanti au efect asupra oxidarilor produse de HG si PDGF-BB individual, dar mai ales asupra puternicului efect oxidant produs de stimularea cu PDGF-BB a CMNV crescute in conditii hiperglicemice/oxidarilor asociate hiperglicemiei survenite la nivelul moleculelor stimulate cu PDGF-BB***

5. In cazul hamsterilor injectati cu streptozotocina, hiperglicemia diabetica determina un dezechilibru in exprimarea proteica a fosfatazelor (PTP-1B) vs. kinazelor (PI_3K si Akt) implicate in calea de semnalizarea a insulinei. Dezechilibrul este asociat cu hiperpermeabilitatea endoteliala si cu apoptoza celulelor musculare netede, si poate sublinia disfunctia peretelui aortic indusa de modificarile acestor celule.

Originalitatea consta in: ***demonstrarea efectelor concentratiei crescute de glucoza circulanta asupra balantei kinazelor/PTP-1B care actioneza la nivelul peretelui aortic, in cazul diabetul de tip I.***

6. Atat obezitatea, dar mai ales obezitatea asociata diabet II, influenteaza expresia moleculelor din calea de semnalizare a insulinei. In arteriolele tesutului adipos subcutan, obezitatea induce o scadere a expresiei proteice a moleculelor din calea de semnalizarea a insulinei, proces incetinit in cazul asocierii obezitatii cu diabetul tip II.

Originalitatea consta in: ***am aratat in paralel ca arteriole subcutane umane de la pacientii obezi si obezi cu diabet tip II prezinta modificari la nivelul moleculelor caii de semnalizare a insulinei cu rol important in evolutia celor doua patologii***.

Dezechilibrul glicemic induce procesele de fosforilare/defosforilare, insotite de multiplelor oxidari reversibile si ireversibile. Toate acestea pot interveni in disfunctia vasculara a peretelui aortic asociata diabetului. Utilizarea antioxidantilor si inhibitorilor de PTPaze poate corecta dereglarile survenite la nivelul celulelor musculare si endoteliale si poate imbunatati functia vasculara. In acest sens utilizarea PTPazelor drept tinte terapeutice poate aduce elemente noi in patofiziologia cardiovasculara.

BIBLIOGRAFIE:

1. Marrero, M.B. Introduction to JAK/STAT signaling and the vasculature. *Vascul Pharmacol*. 2005; **43**: 307–309

2. Choi, K. And Kim, Y.-B., Molecular Mechanism of insulin Resistance in Obesity and type 2 Diabetes. *Korean J Intern Med*. 2010; **25**: 119-129

LISTA LUCRARILOR STIINTIFICE PUBLICATE SI COMUNICATE:

Lucrari publicate in reviste internationale cotate ISI

1. Popov Doina, **Nemecz Miruna**, Dumitrescu Madalina, Georgescu Adriana, Böhmer Frank D. Long-term high glucose concentration influences Akt, ERK1/2, and PTP1B protein expression in human aortic smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 388(1):51-55, 2009 (IF: 2.64)

2. Adriana Georgescu, Doina Popov, Anamaria Constantin, **Miruna Nemecz**, Nicoleta Alexandru, Daniel Cochior, Aura Tudor. Dysfunction of human subcutaneous fat arterioles in obesity alone or obesity associated with Type 2 diabetes. *Clinical Science,* 120(10): 463-472; 2011 (IF: 4.2)- premiat in 2011

3. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, **Miruna Nemecz,** Irina Titorencu, Doina Popov. Enoxaparin reduces adrenergic contraction of resistance arterioles in aging and in aging associated with diabetes via engagement of MAP kinase pathway. *Blood Coagulation and Fibrinolysis,* 22(4): 310:316, 2011 (IF: 1.4)-premiat in 2011

Lucrari publicate in reviste nationale recunoscute CNCSIS

Miruna Nemecz, Doina Popov, Adriana Georgescu. Phosphorylation/dephosphorylation signaling events in the aorta of streptozotocin-injected Golden Syrian Hamsters. Annals of RSCB, vol XV, issue 1, 28-34, 2010, edited by A. Ardelean et. al. (indexat CNCSIS B+)

Rezumate ale lucrarilor prezentate la manifestari stiintifice internationale

1. Microparticles as potential markers in venous insufficiency.A. Georgescu, N. Alexandru, H. Maniu, **M. Nemecz**, D. Popov *in Book of Abstracts , at Romanian Society for Cell Biology at 25 years-Aniversary Workshop:"From Basic Science to Terapeutic Applications"*. p.4, 2007, Bucharest, Romania

2. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Manuela Amuzescu, **Miruna Nemecz,** Constantin Zamfir, Horia Maniu, Adrian Badila. Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles, in *Journal of Vascular Research, vol. 45, supplements 2*, p.146, at *"25th Conference of the European Society for Microcirculation: Integrating Vascular Biology & Medicine Basic and Clinical Science"*,August 26-29, 2008, Budapest, Hungary

3. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Manuela Amuzescu, **Miruna Nemecz,** Eugen Andrei, Constantin Zamfir, Horia Maniu, Adrian Badila, Maya Simionescu. Elevated level of circulating microparticles in chronic venous insufficiency. *in Book of Abstracts*, p. 31, at Biomedicine Workshop"*From fundamental research to therapeutic applications", "Conference, Diaspora in Romanian Sciences Research",* September 17-18, 2008, Bucharest, Romania

4. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Manuela Amuzescu, **Miruna Nemecz,** Constantin Zamfir, Horia Maniu, Adrian Badila. Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles. *Journal of Clinical Lipidology*, vol. 2, no. 5S, p. 64-67- *at 7th International Symposium on "MULTIPLE RISK FACTORS IN CARDIOVASCULAR DISEASES – Prevention and Intervention – Heath Policy"*, October 22-25, 2008, Venice, Italy

5. M. Nemecz, A. Georgescu**,** D. Popov. Protein Tyrosine Phosphatase 1B expression in the smooth muscle cells in aorta in hyperglycemia conditions, at "Biomedicine Workshop, *From fundamental research to therapeutic applications", "Conference, Diaspora in Romanian Sciences Research",* September 17-18, 2008, Bucharest, Romania

6. A. Georgescu**,** N. Alexandru, D. Popov, M. Amuzescu, E. Andrei, **M. Nemecz**, C. Zamfir, A. Badila, M. Simionescu. Elevation of endothelial and platelet microparticles in patients with chronic venous insufficiency, at *XXII Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis* , July 11-16, 2009, Boston , USA

7. L-D. Popov, **M. Nemecz**, M. Dumitrescu, A. Georgescu**,** F. D. Böhmer .Long time culture of human aortic smooth muscle cells in high glucose concentration up-regulates ERK1/2 activation and PTP1B protein expression, at *45th EASD Annual Meeting,* Vienna, Austria, 29.09.2009-02.10.2009, published in *Diabetologia*, 52, Suppl. 1, p.S515, no. 1336, 2009

8. Miruna Nemecz, Adriana Georgescu, Doina Popov. Influence of antioxidants on human vascular smooth muscle cells grown in high glucose, in *Bulletin of Romanian Society for Cell Biology*, p. 91, no.39, at The *3rd International Congress and 29th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology*, June 8-12, 2011, Arad-Szeged, Romania-Hungary

9. Miruna Nemecz, Adriana Georgescu, Doina Popov. The effect of antioxidants on high glucose and platelet derived growth factor stimulated human vascular smooth muscle cells. *'Inflammation and Cardiovascular Disease" Summer School*, Obergurgl, Austria, September 29 - October 2, 2011

10. Adriana Georgescu**, Miruna Nemecz**, Nicoleta Alexandru, Aura Tudor, Daniel Cochior, Doina Popov**.** Dysfunction of Human Subcutaneous Fat Arterioles in Obesity Alone or Obesity Associated with Type 2 Diabetes, *at '4th Annual Meeting of the Diabetes and Cardiovascular Disease EASD Study Group',* October 27–29, 2011, Munich, Germany, Book of Abstracts, p.37.

11. M. Nemecz, A. Georgescu**,** D. Popov, M. Simionescu. Influence of catalase and superoxide dismutase on human vascular smooth muscle cells grown in high glucose. at *'4th Annual Meeting of the Diabetes and Cardiovascular Disease EASD Study Group',* October 27-29, 2011, Munich, Germany, Book of Abstracts, p.33

Rezumate ale lucrarilor prezentate la manifestari stiintifice nationale

1. A. Georgescu**,** N. Alexandru, M. Amuzescu, **M. Nemecz**, C. Zamfir, H. Maniu, A. Badila, D. Popov. Insuficienta venoasa cronica este asociata cu un nivel crescut de microparticule circulante/ Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles, *in Buletinul SNBC/ in Bulletin of Romanian Society for Cell Biology* , pag . 50/p. 50, nr.36/no.36, *la a XXVI-A Sesiune Stiintifica Anuala a Societatii Nationale de Biologie Celulara/ at The 26th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology ,* 12-15 iunie 2008/ June 12-15, 2008, Cluj-Napoca, Romania

2. Miruna Nemecz, Adriana Georgescu**,** Doina Popov. Expresia protein tirozin fosfatazei 1B in celulele musculare netede si aorta in conditii de glucoza crescuta/The expression of protein tyrosine phosphatase 1B in smooth muscle cells and aorta in hyperglycemia conditions, *in Buletinul SNBC/ in Bulletin of Romanian Society for Cell Biology* , pag . 52/p.52, nr.36/no.36, la a *XXVI-A Sesiune Stiintifica Anuala a Societatii Nationale de Biologie Celulara/ at The 26th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology,* 12- 15 iunie/June 12-15, 2008, Cluj-Napoca, Romania

INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ "N. SIMIONESCU"

PROIECT

TERAPIE DIRECȚIONATĂ BAZATĂ PE NANOCARRIERI BIOMIMETICI PENTRU REZOLUȚIA INFLAMAȚIEI ÎN ATEROSCLEROZĂ

(NANORES)

Contract PN-III-P4-ID-PCE-2020-2465

nr. PCE 68/2021

Etapa 1 (2021): Conceperea, prepararea și caracterizarea nanocărăușilor pentru livrarea țintită a resolvinelor

Rezumatul etapei 1/2021:

Au fost obținute 3 tipuri de nanocărăuși încărcați cu resolvine, și anume nanoemulsii lipidice (P-NC/Res), nanoemulsii lipidice conjugate cu peptide de recunoaștere specifică a unor epitopi vasculari (T-NC/Res) și nanocărăuși biomimetici obținuți folosind membrane celulare izolate din monocite/ macrofage (Bio-NC/Res). Caracterizarea fizico-chimică a nanocărăușilor încărcați cu resolvine a constat în determinarea dimensiunii, încărcării electrice de suprafață, a eficienței de încorporare a resolvinelor în nanocărăuși și a stabilității acestora în timp și în medii biologice.

Au fost indepliniți toți indicatorii de realizare propuși, și anume: 1 raport cu privire la obținerea și caracterizarea fizico-chimică, la scară de laborator, a diverselor tipuri de nanocărăuși încărcați cu resolvine depus la UEFISCDI, diseminarea rezultatelor prin realizarea paginii web a proiectului (http://www.icbp.ro/static/en/en-networking_grants-grants-national_grants/nanores.html) și participarea cu 6 lucrări la Conferinte naționale și internaționale (4 prezentări orale și 2 postere). În plus, au fost publicate 2 articole în reviste cotate ISI.

Diseminarea și valorificarea rezultatelor cercetării

Articole publicate în reviste ISI

1) Turtoi M, Anghelache M, Bucatariu SM, Deleanu M, Voicu G, Safciuc F, Manduteanu I, Fundueanu G, Simionescu M, Calin M. A novel platform for drug testing: Biomimetic three-dimensional hyaluronic acid-based scaffold seeded with human hepatocarcinoma cells. Int J Biol Macromol. **2021** Aug 31; 185: 604-619. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.174. Epub 2021 Jul 1. PMID: 34216662. **(Factor de impact 6.0953)**

2) Mocanu CA, Fuior EV, Voicu G, Rebleanu D, Safciuc F, Deleanu M, Fenyo IM, Virginie Escriou V, Manduteanu I, Simionescu M, Calin M, P-selectin targeted RAGE-shRNA lipoplexes alleviate atherosclerosis-associated inflammation, J Control Release. 2021 Oct 10; 338:754-772. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.09.012. **(Factor de impact 9.776)**

Participare la conferințe științifice naționale și internaționale

Prezentari orale

1) Manuela Calin, Targeted therapies based on nanocarriers to reduce vascular inflammation, 7th Nanomaterials and Nanotechnology Meeting, 17-20 mai 2021, Ostrava, Cehia, eveniment on-line.

2) Manuela Calin, Nanocarriers-based drug delivery to specific targets of the inflamed vascular wall, a“23-a Conferinta Internationala „Materials, Methods & Technologies”, perioada 19-22 august 2021, Burgas, Bulgaria.

3) Manuela Calin, P-selectin directed RAGE-shRNA nanocarriers reduce atherosclerosis-associated inflammation in ApoE-deficient mice, Al 42-lea Simpozion Aniversar al Institutului de Biologie si Patologie Celulara “Nicolae Simionescu” organizat impreuna cu a 38-a Sesiune Stiintifica Anuala a Societatii Romane de Biologie Celulara, 4-6 noiembrie 2021, eveniment online.

4) Maria Anghelache, Mariana Deleanu, Mihaela Turtoi, Geanina Voicu, Ileana Manduteanu, Manuela Calin, Preparation and characterization of macrophage-membrane-coated nanoemulsions for delivery of specialized pro-resolving lipid mediators of inflammation, Al 42-lea Simpozion Aniversar al Institutului de Biologie si Patologie Celulara “Nicolae Simionescu” organizat impreuna cu a 38-a Sesiune Stiintifica Anuala a Societatii Romane de Biologie Celulara, 4-6 noiembrie 2021, eveniment online.

Postere

1) M. Anghelache, M. Deleanu, M. Turtoi, G. Voicu, M. Calin, Preparation and Physico-Chemical Characterization of specialized pro-resolving lipid mediators (SPMs)-Loaded Nanoemulsions as Nanocarriers for Inflammation Resolution, The 18th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN21), 6-9 iulie 2021, Salonic, Grecia.

2) G. Voicu, M. Turtoi, M. Anghelache, S. Bucatariu, M. Deleanu, F. Safciuc, I. Manduteanu, G. Fundueanu, M. Simionescu, M. Calin. A three-dimensional hyaluronic acid-based scaffold seeded with human cancer cells functions as a suitable platform for antitumoral drug screening. The 18th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN21), 6-9 iulie 2021, Salonic, Grecia.

INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ "N. SIMIONESCU"

PROIECT

TERAPIE DIRECȚIONATĂ BAZATĂ PE NANOCARRIERI BIOMIMETICI PENTRU REZOLUȚIA INFLAMAȚIEI ÎN ATEROSCLEROZĂ

(NANORES)

Contract PN-III-P4-ID-PCE-2020-2465

nr. PCE 68/2021

Etapa 2 (2022): Validarea preclinică a nanocărăușilor concepuți pentru livrarea țintită a resolvinelor - studii in vitro

Rezumatul etapei 2/2022:

În etapa 2/2022 a proiectului NANORES, au fost efectuate studii pentru evaluarea citocompatibilității nanocărăușilor încărcați cu resolvine, preluarea acestora de către celulele peretelui vascular (celule endoteliale și celule musculare netede) și celule ale sistemului imun (macrofage) și au fost determinate proprietățile lor anti-inflamatorii.

Au fost indepliniți toți indicatorii de realizare asumați pentru etapa nr. 2, și anume:

● **1 raport** cu privire la citocompatibilitatea diferitelor tipuri de nanocărăuși încărcați cu resolvine, preluarea acestora de către celulele peretelui vascular și investigarea proprietăților lor anti-inflamatorii trimis la UEFISCDI;

● **diseminarea rezultatelor** prin participarea cu **7 lucrări la Conferinte naționale și internaționale** (2 prezentări orale și 5 postere) și **trimiterea spre publicare** a unui articol în revista ISI, Journal of Controlled Release, factor de impact 11.47.

● **Pagina web** a proiectului este disponibilă la adresa http://www.icbp.ro/static/en/en-networking_grants-grants-national_grants/nanores.html.

● **Pozitia vacantă** în cadrul proiectului a fost ocupată prin concurs de un student masterand la Facultatea de Biologie, Universitatea Bucuresti (http://www.icbp.ro/news/en/10-generale/310-concurs_pentru_un_post_temporar_vacant_de_asistent_de_cercetare_stiintifica_cu_norma_intreaga/).

Articole publicate în reviste indexate ISI

1. Anghelache Maria, Deleanu Mariana, Voicu Geanina, Turtoi Mihaela, Safciuc Florentina, Anton Ruxandra, Tanko Gabriela, Manduteanu Ileana, Simionescu Maya and Calin Manuela, Biomimetic nanocarriers of pro-resolving lipid mediators for inflammation resolution in atherosclerosis. Trimis spre publicare in revista ISI, J Control Release **(Factor de impact 11.47)**, in evaluare.

Participare la conferințe științifice naționale și internaționale

Prezentari orale

1. Călin M, "Biomimetic nanocarriers for targeted vascular inflammation resolution", a "24-a Conferinta Internationala „Materials, Methods & Technologies", 19-22 august 2022, Burgas, Bulgaria, Prezentare orală.

2. Călin M., Biomimetic nanocarriers for inflammation resolution in atherosclerosis, ICBP-NS Annual Scientific Symposium with International Participation under the aegis of the Romanian Academy: "43 Years on the never-ending road of cardiovascular discoveries", 8 Decembrie, 2022.

Postere

1. Călin M., Mocanu C.A., Voicu G., Safciuc F., Manduteanu I., Simionescu M., "Endothelium-targeted RAGE-shRNA nanocarriers reduce atherosclerosis-associated inflammation ", 7th International Congress on Biomaterials & Biosensors" (BIOMATSEN2022), 22-28 April 2022, Fethiye–Mugla, Turkey, Poster.

2. Anghelache M, Deleanu M, Turtoi M, Voicu G, Călin M, Development of biomimetic nanocarriers for delivery of specialized pro-resolving lipid mediators (SPMs) to atherosclerotic plaque, a "24-a Conferinta Internationala „Materials, Methods & Technologies", 19-22 august 2022, Burgas, Bulgaria, Poster.

3.Voicu G, Anghelache M, Deleanu M, Turtoi M, Safciuc F, Călin M, Dual targeted lipid nanoemulsions for vascular delivery of specialized pro-resolving lipid mediators in atherosclerosis, a "24-a Conferinta Internationala „Materials, Methods & Technologies", 19-22 august 2022, Burgas, Bulgaria, Poster.

4. Anghelache M, Deleanu M, Anton R, Turtoi M, Voicu G, Manduțeanu I, Simionescu M, Călin M, Development of biomimetic nanocarriers for delivery of pro-resolving mediators to atherosclerotic plaque, International Conference and XXXIX Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology (RSCB), Cluj-Napoca Romania, October 2022. (E-Poster).

5. Voicu G, Anghelache M, Deleanu M, Turtoi M, Safciuc F, Manduțeanu I, Simionescu M, Călin M, Design of dual-targeted lipid nanoemulsions for vascular delivery of specialized pro-resolving lipid mediators in atherosclerosis, International Conference and XXXIX Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology (RSCB), Cluj-Napoca Romania, October 2022. (E-Poster).

Scientific Report (02/05/2018 — 20/12/2018)

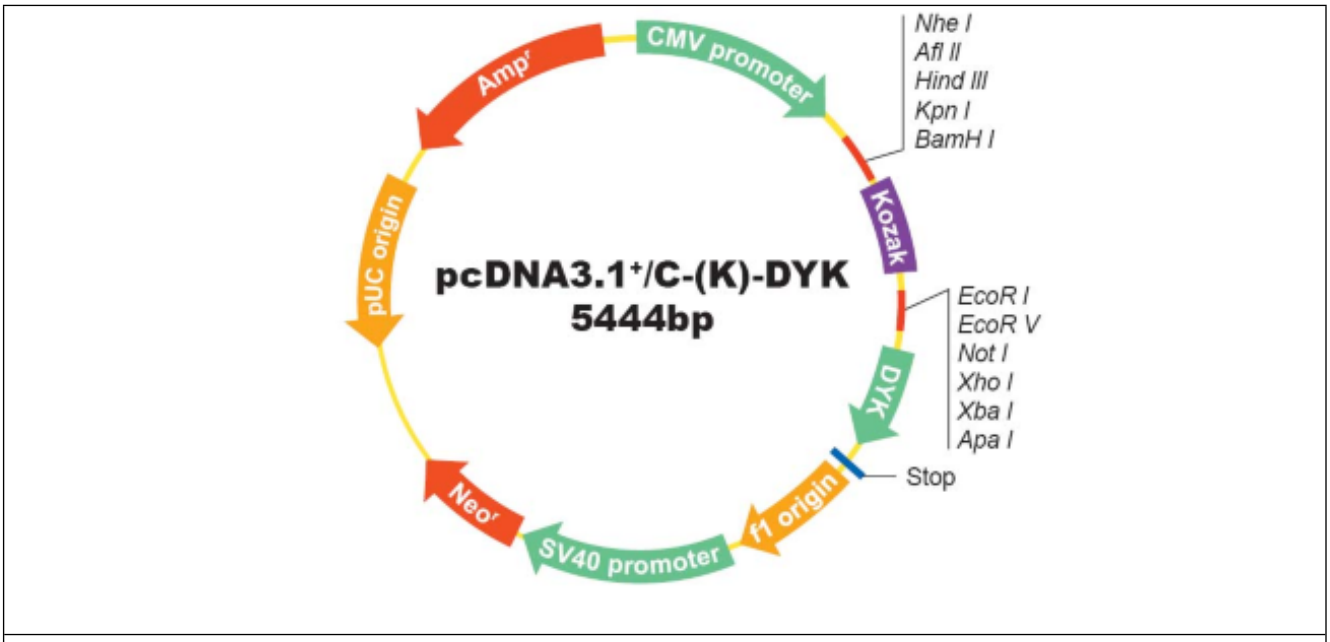
Project PN-III-P1-1.1-PD-2016-1942

"Evaluation of the therapeutic potential of non-viral apolipoprotein E gene transfer to limit progression of atherosclerosis"

Generation of non-viral transfection agents for expression of apoE3 or its fragments

1. Cloning of apoE3 sequence or its N-/C-terminal deletion fragments in a non-viral vector

The human apoE3 sequence and the N-/C-terminal regions were cloned into the non-viral vector pcDNA3.1+C-K-DYK. Driven by a CMV promoter, this expression vector for mammalian cells is equipped with a C-terminal DYK tag for easy protein detection.



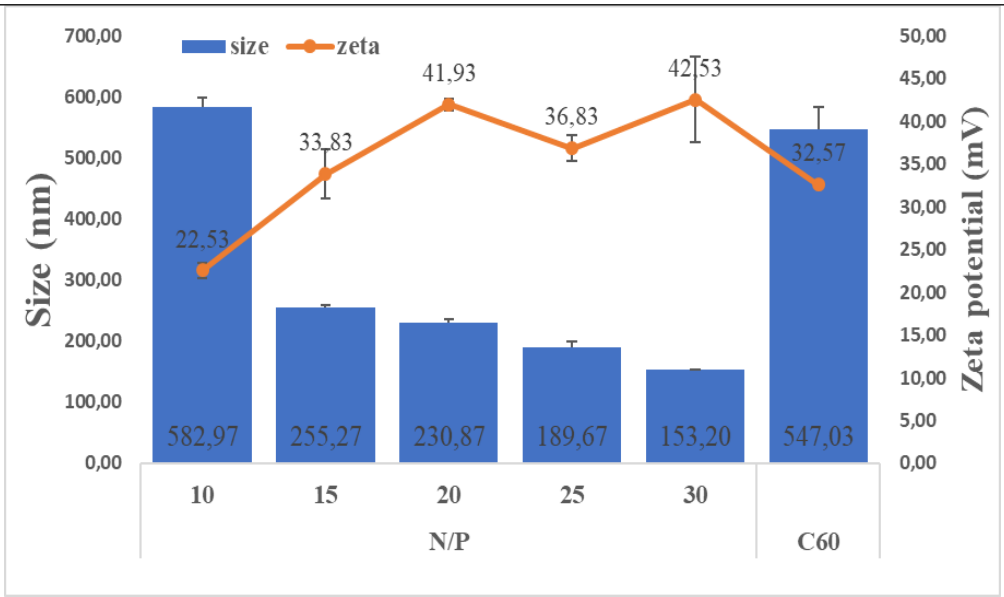
Schematic representation of the non-viral vector pcDNA3.1+C-K-DYK (5444 pb).

The entire apoE3 sequence was cloned into pcDNA3.1+C-K-DYK in EcoRI and XbaI sites. In addition, in the non-viral vector pcDNA3.1+C-K-DYK the following apoE fragments were cloned:

1. apoESSH1H2: containing the signal sequence and the first two helixes
2. apoESSH1H2RBR: containing the signal sequence, two helixes, the receptor binding region
3. apoESSH1H2RBRLBR: containing the signal sequence, two helixes, the receptor binding region and the lipid binding region
4. apoEwoRBR: containing the entire apoE sequence except for the receptor binding region
5. apoEwoLBR: containing the entire apoE sequence except for the lipid binding region

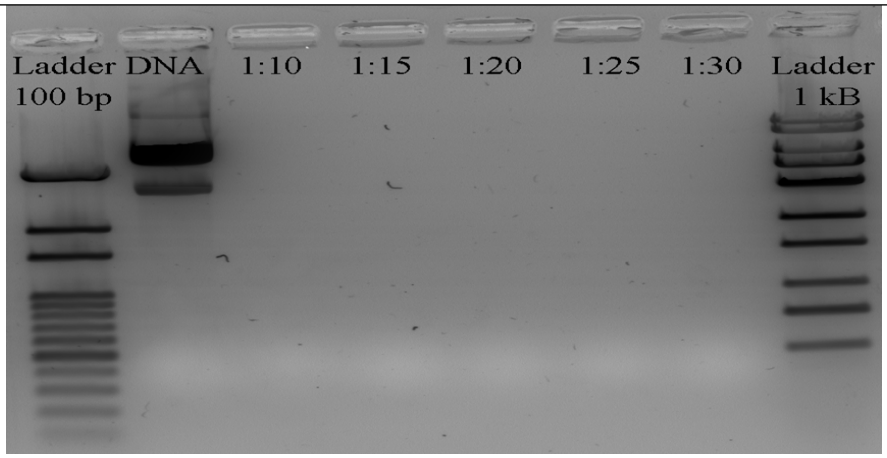
2. Coupling of the obtained plasmids to fullerene (C60) using polyethyleneimine (PEI)

To determine the optimal ratio of C60-PEI – DNA (non-viral vector) in order to obtain C60-PEI-DNA polyplexes, the C60-PEI conjugates were incubated with DNA at various N/P ratios (1:10, 1: 15, 1:20, 1:25 and 1:30), where N represents the nitrogen content of C60-PEI, and P represents the phosphorus content of the DNA. The size and zeta potential of the polyplexes were determined using a Nanosizer (Malvern). As indicated in the following figure, the C60-PEI conjugate exhibits a size of ~547 nm and a zeta potential of ~32.5 mV. In this case, the value of the hydrodynamic diameter is high and it can be attributed to expanding of the PEI chains, forming a physical network. C60-PEI-DNA polyplexes have sizes in the range 153-582 nm and zeta potential in the range of 22.5-42 mV. In the case of C60-PEI-DNA polyplexes with increasing N/P ratio, there is a decrease in size as well as an increase in zeta potential.



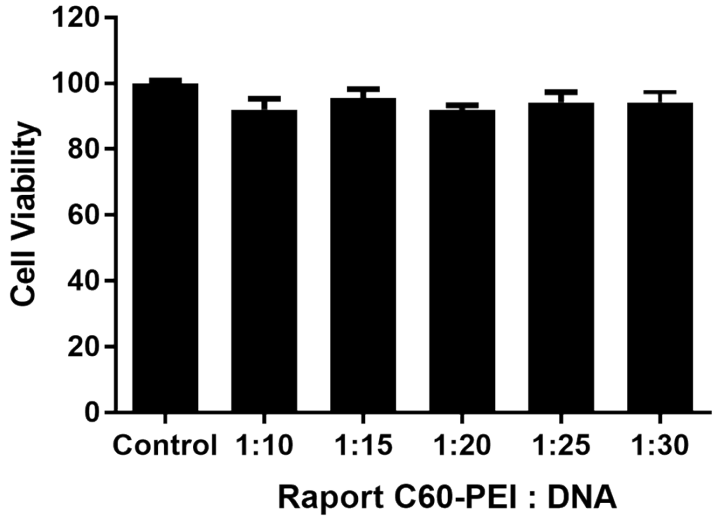
Size and zeta potential of C60-PEI-DNA polyplexes at the following N/P ratios: 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30.

The ability of the C60-PEI conjugate to bind DNA was tested agarose gel retardation assays. The C60-PEI conjugates were incubated with DNA at various N/P ratios (1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30). The DNA concentration was maintained constant (1 μg/well) and the C60-PEI concentration increased according to the N/P ratio used (1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30). As shown in the figure below, the C60-PEI polyplexes have an excellent DNA binding capability since for all N/P ratios tested (including low N/P ratios, such as 1: 1 and 1:10) the DNA was complexed by C60-PEI. These results demonstrate that C60-PEI can be used in the generation of C60-PEI-DNA polyplexes at low N/P ratios for cell transfection purposes.



Testing the C60-PEI capacity to bind DNA by agarose gel retardation assays.

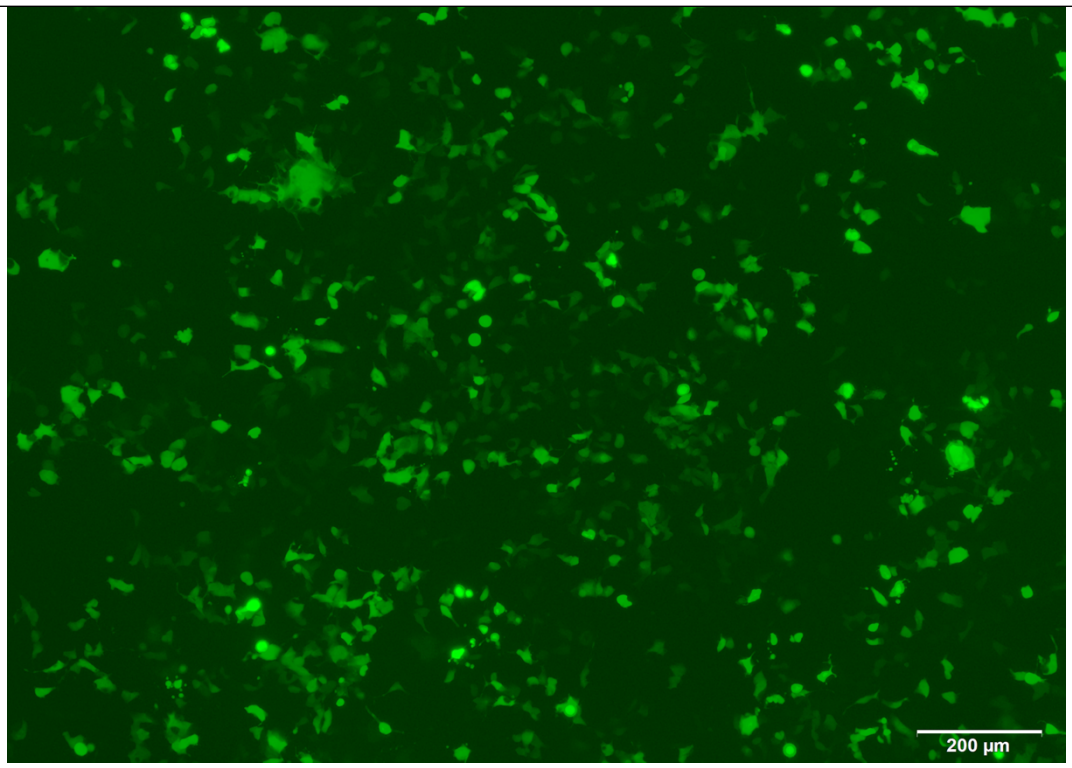
The viability of AD293 cells in the presence of C60-PEI-DNA polyplexes with various N/P ratios was determined by XTT technique. Cells were seeded in 96-well plates at a density of 10,000 cells/well in quadruplicate. One the day after seeding, C60-PEI-DNA polyplexes with various N/P ratios (1:10, 1:15, 1:20, 1:25 and 1:30) were added to the adherent cells. After 48 hours of incubation, cell viability in the presence of C60-PEI-DNA polyplexes was determined by XTT technique. As shown in the following figure, the C60-PEI-DNA polyplexes (irrespective of the N/P ratio used) have not significantly influenced cell viability, suggesting that C60-PEI-DNA polyplexes can be used in cell transfection processes.



The effect of C60PEI DNA polyplexes on cell viability.

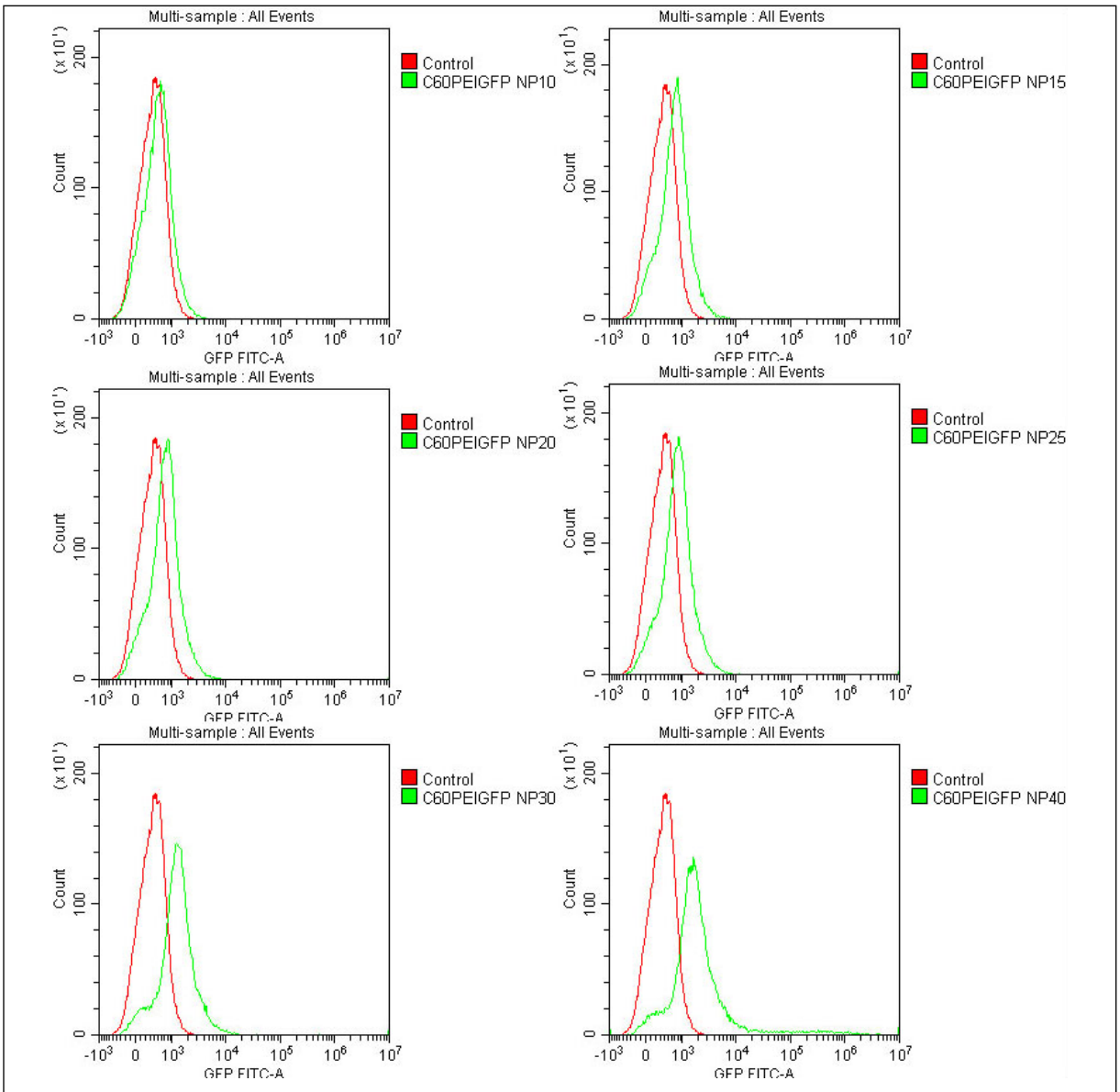
3. Testing the functionality of C60-apoE/GFP polyplexes as non-viral transfection agents

To test whether C60-PEI-DNA polyplexes can be used as transfection agents, the C60-PEI conjugates have been complexed with a specific DNA able to induce green fluorescence protein (GFP) expression that can be monitored by fluorescence microscopy. As illustrated in the following figure, AD293 cells were successfully transfected with C60-PEI-pGFP polyplexes.



AD293 cells transfected with C60-PEI-pGFP (this image was taken using a fluorescence microscope).

GFP expression in AD293 cells transfected with C60-PEI-pGFP polyplexes was also evaluated by flow cytometry. For this, AD293 cells were transfected with C60-PEI-pGFP polyplexes at various N/P ratios (1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:40) and GFP expression was analyzed using a flow cytometer (Cytoflex). As shown in the figure below, GFP expression in cells transfected with C60-PEI-pGFP polyplexes increases as the N/P ratio increases.



Flow cytometry analysis of cells transfected with C60-PEI-pGFP polyplexes using increasing N/P ratios: 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:40.

In conclusion, the results obtained this year in this project are summarized below:

1. The total sequence of apoE3 and five fragments of apoE were cloned into the non-viral vector pcDNA3.1+C-K-DYK
2. The obtained plasmids were coupled to fullerene (C60)-polyethyleneimine (PEI)
3. Functionality of C60-PEI-GFP polyplexes as non-viral transfected agents has been demonstrated *in vitro:* AD293 cells were successfully transfected with C60-PEI-pGFP (as shown by fluorescence microscopy, immunoblotting and flow cytometry experiments)

Dissemination of results:

1. Bisphenol A down-regulates hepatic apolipoprotein A1 expression, VG. Trusca, M. Dumitrescu, IM. Fenyo, IF. Tudorache, AV. Gafencu, poster presented at „ The 10th National Congress with International Participation and the 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society of Cell Biology" Craiova, Romania, 6-9 June 2018
2. Bisphenol A down-regulates apolipoprotein A1 expression and exerts pro-atherogenic effects, VG. Trusca, M. Dumitrescu, IM. Fenyo, IF. Tudorache, AV. Gafencu, poster presented at "The 12th Central and Eastern European Proteomic Conference", Bucharest, Romania, 24 - 26 October, 2018

The results obtained in the project are part of a manuscript in preparation.

Tissue engineering of blood vessels using three-dimensional bioprinting of endothelial and smooth muscle progenitor cells

PN-III P1-1.1-PD-2016-1660

Phase II report – 2019

Abstract

Although autologous vascular grafts are the gold standard for clinical use, they are not suitable for a large number of patients due to vascular disease, amputations or previous vascular tissue harvesting. Despite the clear clinical needs of vascular substitutes, currently available synthetic grafts have proven to be successful only in large-calibre implant implants; small diameter vascular substitutes (<6 mm) have generally unsatisfactory results, with major negative side effects, such as acute thrombosis, hyperplasia and aneurysm. Therefore, biomimetic reconstruction of blood vessels through tissue engineering remains a difficult task that requires new construction techniques. The project aims to realize bioprinted vascular structures and to investigate the biocompatibility of endothelial and muscle progenitor cells in the presence of collagen and hyaluronic acid hydrogels. The obtained results showed that the cells are viable in the presence of the 3 hydrogels for 21 days. Endothelial and muscle progenitor cells are not subjected to oxidative stress and proliferate better in the presence of hydrogels than when grown in culture plates (2D system). The most intense proliferation was recorded in the hydrogel with 50% hyaluronic acid (H50), both at 7 days and at 21 days, respectively. In vascular constructs the level of VEGF is higher than in 2D system at 7 days. After 21 days of cultivation, the concentration of VEGF in vascular constructs H50 was 0.29 ng/ml, in H25 0.19 ng/ml and in H0 0.21 ng/ml comparable to EPCs cultured in 2D system (0.2 ng/ml). Also, the detection of VEGF in the EPC cultures obtained from AFSC shows that the differentiation towards the endothelial line occurred. The highest amount of nitric oxide was identified in the H50 hydrogel reaching values of 10.7 μM and 5.65 μM at 7 days and 21 days respectively. The results show that EPC and SPC express CD44 at 100% and CD49e at 99% for EPC and 94% for SPC. EPC shows increased expression for the CD54 (25%), CD56 (38%), CD105 (95.5%) markers. Also, markers CD73, CD90, and CD146 are expressed by both EPC and SPC in percentages between 70-100%. The hydrogels have a porous structure, forming large pores with a diameter between 40-150 μM. In the presence of hydrogels, the cells have a fusiform morphology and emit filopods that allow the interaction between cells and with collagen fibres.

Introduction

Cardiovascular diseases are the leading causes of mortality worldwide and require over one million bypass / blood vessel replacements annually in the United States alone [1]. Although autologous vascular grafts are the gold standard for clinical use, they are not suitable for a large number of patients due to vascular disease, amputations or previous vascular tissue harvesting. Despite the clear clinical needs of vascular substitutes, currently available synthetic grafts (for example, Dacron and Teflon) have proven to be successful only in large calibre implants; small diameter vascular substitutes (<6 mm) have generally unsatisfactory results, with major negative side effects, such as acute thrombosis, hyperplasia and aneurysm [2]. Arterial failures are generally attributed to the relatively low blood flow rate in these small vessels, which increases the rate of interactions between cells and molecules in the blood and polymeric implants. Therefore, there are strict requirements regarding the biofunctionality of the small diameter designed grafts. In order to produce grafts with normal vascular functions, at least 2 requirements must be met: (1) there is a confluent endothelium providing a nontrombogenic interface and (2) there is smooth contractile muscle tissue that can withstand haemodynamic stress and local changes in blood pressure that occur through constriction and physiological relaxation of the vessel [3]. Tissue engineering has emerged as a promising alternative approach for viable small diameter arterial grafts. Various strategies including decellularized tissue, synthetic polymeric matrices, self-assembling cell layers and hydrogels have been used to create living vascular structures and replace native blood vessels; these strategies have achieved different levels of success. These approaches generally produce vascular substitutes in the form of a robust tubular matrix containing smooth vascular or fibroblast muscle cells followed by seeding and cultivation of endothelial cells to achieve endothelialisation. This multi-step construction process is slow and requires complicated procedures and long manufacturing periods. In addition, grafting and retention rate of endothelial cells is strongly influenced by seeding mode, surface properties, cell density and culture conditions and, therefore, current methods can hardly be considered reliable for generating an intact functional endothelium. Therefore, biomimetic reconstruction of blood vessels through tissue engineering remains a difficult task that requires new construction techniques [4-7]. An important advantage of 3D bioprinting is the ability to build tissue / organ equivalents with a structure as close as possible to the native one. The precise positioning of cell-loaded bioinks simulates the anatomical features of the target tissue / organ, so that as cells proliferate, migrate and differentiate into a biomimetic construct. In particular, coaxial extrusion technique can use various biomaterials for bioprinting resulting in vessel-like structures [8].

For the successful bioprinting of a functional vessel, an essential factor is the bioink used. It must be biocompatible with the different cell types and promote the functionality of the cells and also allow the direct bioprinting of the vessels. While the hydrogels used to create vessels (fibrin, elastin, collagen, fibroin) generally have poor printability, materials suitable for co-extrusion bioprinting (alginate, gelatine methacryloyl, photopolymerized hyaluronic acid) usually have negative results due to low cellular affinity or poor mechanical properties and the functionality of the tissues is impaired.

The project aims to create vascular structures using collagen and hyaluronic acid hydrogels and endothelial and muscle progenitor cells derived from mesenchymal stem cells isolated from amniotic fluid using 3D bioprinting. Thus, the objectives for 2019 were:

I. "*Realization of the bioprinted vascular structure and investigation of the biocompatibility of EPC and SPC in the presence of the used hydrogels*". These objectives have the following activities:

I.1 *3D bioprinting of vascular structure and assessment of viability and growth of differentiated progenitor cells;*

I.2 *Research on cell proliferation, oxidative stress and phagocytosis*;

I.3 *Analysis of the secretory profile of EPC and SPC incorporated in the hydrogel*.

II. *"Evaluation of the morphology and adhesion capacity of EPC and SPC incorporated in the hydrogel".* This objective is accompanied by the following activities:

II.1 *Analysis of the rearrangements of actin filaments and microtubules by immunofluorescence*;

II.2 *Evaluation of cell morphology by scanning / transmission electron microscopy*.

I.1 3D bioprinting of vascular structure and assessment of viability and growth of differentiated progenitor cells.

Computer-aided design (CAD) software (BioCad, RegenHU, Switzerland) was used to create the 3D vascular model. Bioprinting was performed using a needle with a diameter of 0.2 mm, under pressure of 1.2 bar, speed of 1 mm / sec, creating vascular structures with a diameter of 2.5 mm, the thickness and the height of each layer 0.3 mm, followed by polymerization of each layer for 5 seconds (Fig. 1).

Fig. 1. Bioprinted 3D vascular structure using collagen-hyaluronic acid hydrogel and progenitor cells

For bioprinting, 3 hydrogels were used:

- H0, collagen hydrogel containing 2% collagen, RehenHu (Villaz-St-Pierre, Switzerland)
- H25, H0 hydrogel towhich 25% hyaluronic acid (MW 1-1.6 MDa, 1%) was added
- H50 H0 hydrogel to which 50% hyaluronic acid (MW 1-1.6 MDa, 1%) was added

Mesenchymal stem cells isolated from amniotic fluid (AFSC) were differentiated into endothelial (EPC) and muscle (SPC) progenitor cells using specific culture media and growth factors.

Endothelial differentiation of AFSC was achieved by cultivation in M200 medium supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum), 40 ng / ml vascular endothelial growth factor (VEGF), 20 ng / ml insulin growth factor (IGF-1), 10 ng / ml epidermal growth factor (EGF), 10 ng / ml fibroblast growth factor (bFGF), 100 μg / ml penicillin, 100 μg / ml streptomycin and 50 μg / mL neomycin (Merck, Frankfurter, Germany).

Muscle differentiation was performed in M231 medium supplemented with FGF (2 ng / ml), EGF (0.5 ng / ml), heparin (5 ng / ml), IGF (2 pg / ml) and bovine serum albumin (0.2 pg / ml). The cells were maintained in these environments for 4 weeks and passed to reach the subconfluence. Cell cultures were maintained at 37°C with 5% CO_2 and 21% O_2 in a humidified atmosphere.

Viability assessment was performed using the LDH test (ThermoFischer Scientific, USA). This test measures the amount of LDH (lactate dehydrogenase) in the culture medium. LDH is a cytosolic enzyme and its presence in the culture medium demonstrates that the cells were destroyed and released extracellular LDH. Vascular constructs with EPC and SPC cultured for 21 days in DMEM medium were evaluated to determine cell viability at 7 days and 21 days.

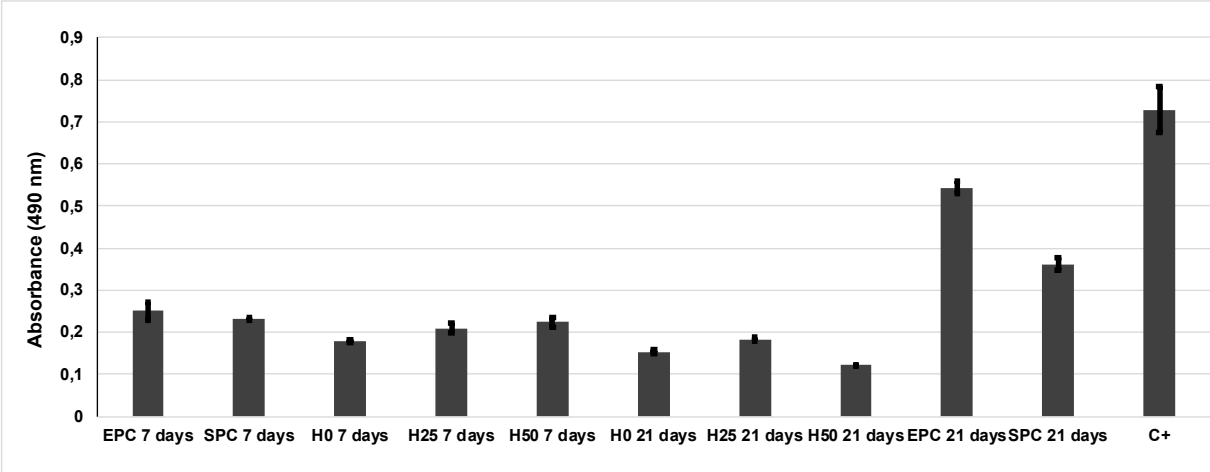


Fig. 2 Assessment of the viability of EPC and SPC in H0, H25 and H50 hydrogels, at 7 and 21 days using LDH assay

The obtained results showed that the cells are viable in the presence of the 3 hydrogels for 21 days. At 21 days EPC and SPC grown in plates without hydrogel (2D system) showed a high level of LDH compared to those in hydrogels, which suggests that collagen-hyaluronic acid hydrogels provide an optimal environment for cell growth (Fig. 2).

I.2 Research on cell proliferation, oxidative stress and phagocytosis

The cellular proliferation of EPC and SPC in hydrogels was investigated using the MTT assay. Based on this quantitative colorimetric method, the proliferation, viability and cytotoxicity of the cell are assessed. The method is based on reducing a yellow MTT tetrazolium salt (3- (4,5-dimethylthiazolyl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) to dark-blue formazan. The reduction achieved by mitochondrial enzymes (especially succinate dehydrogenase) is an indication of cellular / mitochondrial integrity. The insoluble formazan can be solubilized with isopropanol, dimethyl-sulfoxide or other organic solvent. The optical density (DO) of the solubilized formazan is evaluated spectrophotometrically, obtaining a function absorbance-concentration dye-number of metabolically active cells in culture. Vascular constructions grown for 7 days and 21 days, were treated with 15 µl 12 mM MTT and incubated at 37°C for 4 hours. Subsequently, 100 µl SDS-HCl solution was added, and energetically pipetted to solubilize formazan crystals, followed by one-hour incubation. Then pipetted for homogenization and remove all the bubbles to not interfere with reading. The reading was performed at the spectrophotometer at 570 nm (TECAN, Männedorf, Switzerland).

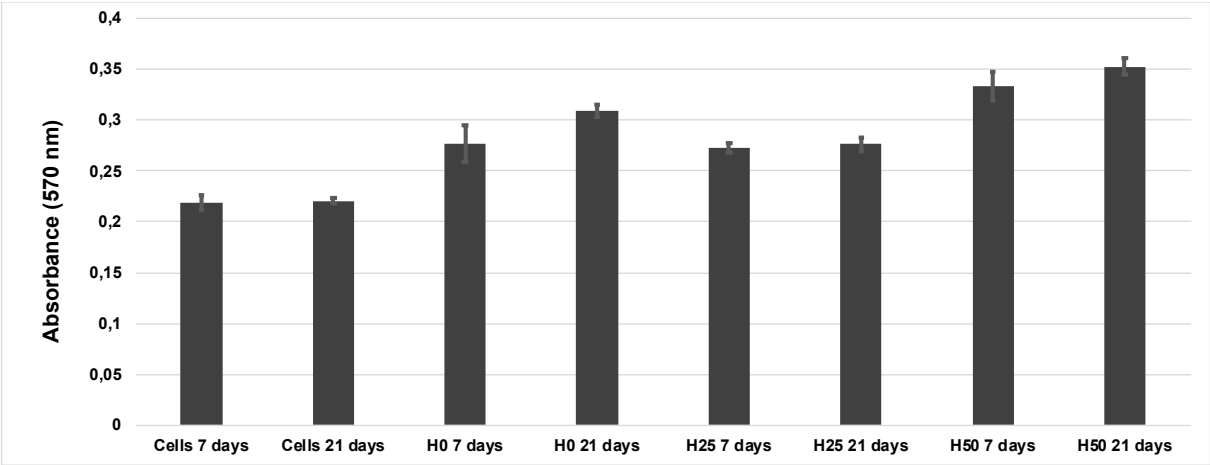


Fig. 3 Evaluation of EPC and SPC proliferation in H0, H25 and H50 hydrogels, at 7days and 21 days using the MTT assay

The results showed that the cells proliferate better in the presence of hydrogels than when grown in culture plates (2D system). In the hydrogel with 50% hyaluronic acid (H50) the most intense proliferation was recorded, both at 7 days and at 21 days. The H0 hydrogel caused an increase in proliferation by 28% at 7 days and 36% at 21 days compared to cells grown in 2D system. The H25 hydrogel allowed cell proliferation for 21 days, resulting in an increase in proliferation by 28% at 7 days and 22% at 21 days compared to cells grown in the 2D system. Hydrogel with 50% H50 hyaluronic acid caused a proliferation of over 57% at 7 days and 59% at 21 days compared with 2D control (Fig. 3).

Oxidative stress assessment was performed using the GHS assay. This kit measures the amount of glutathione, an antioxidant agent. The glutathione produced by the cells is transformed by glutathione S-transferase into oxidized glutathione, the amount of glutathione transformed being directly proportional to the amount of glutathione S-transferase enzyme that transforms glutathione linked with a luciferin precursor into oxidized glutathione linked to luciferin which emits light. The more intense the light, the more glutathione was transformed, so more glutathione was synthesized, so the cell was more stressed. Oxidative stress was assessed using the Glutathione Fluorescent Detection Kit (Invitrogen, ThermoFischer Scientific, USA).

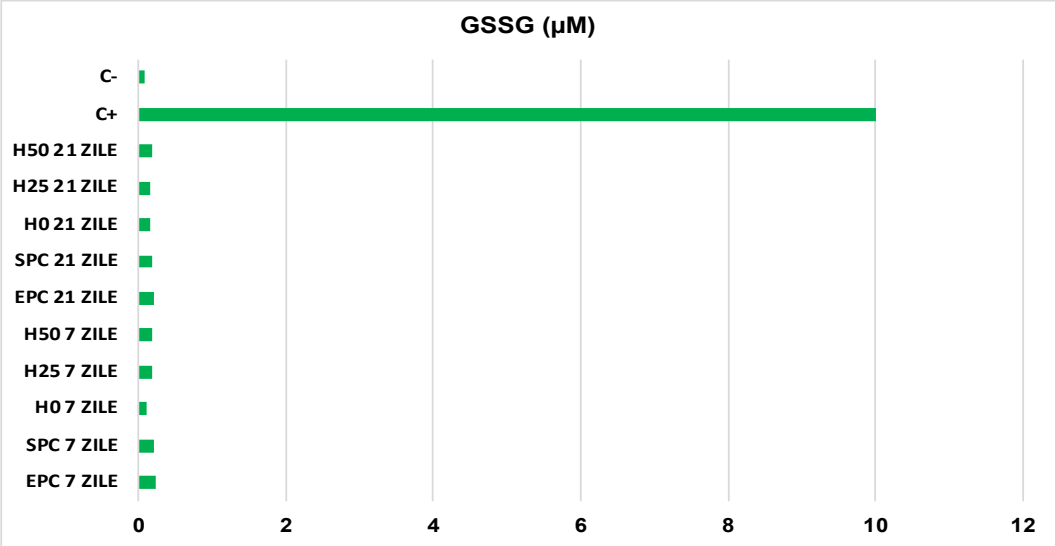


Fig. 4 Assessment of the oxidative stress of EPC and SPC in H0, H25 and H50 hydrogels, at 7 days and 21 days using GSH assay

The results showed that EPC and SPC grown in vascular constructions for 7 days and 21 days are not subjected to major oxidative stress. The highest concentration of oxidized glutathione (GSSG) was in cells grown in 2D system (0.22 µM for EPC and 0.21 µM for SPC). For the H0 hydrogel the GSSG values were 0.11µM and 0.16µM at 7 days and 21 days respectively. The H25 hydrogel recorded GSSG values of 0.18 µM and 0.16 µM, and in the H50 hydrogel the GSSG level was 0.18 µM at 7 days and 0.17 µM at 21 days from cultivation (Fig. 4).

I.3 Analysis of the secretory profile of EPC and SPC incorporated in the hydrogel

In order to demonstrate the ability of EPC and SPC to participate in vascularization, the production of VEGF and nitric oxide in the hydrogels was determined. The production of VEGF was quantified by the ELISA technique and that of nitric oxide using the Griess test.

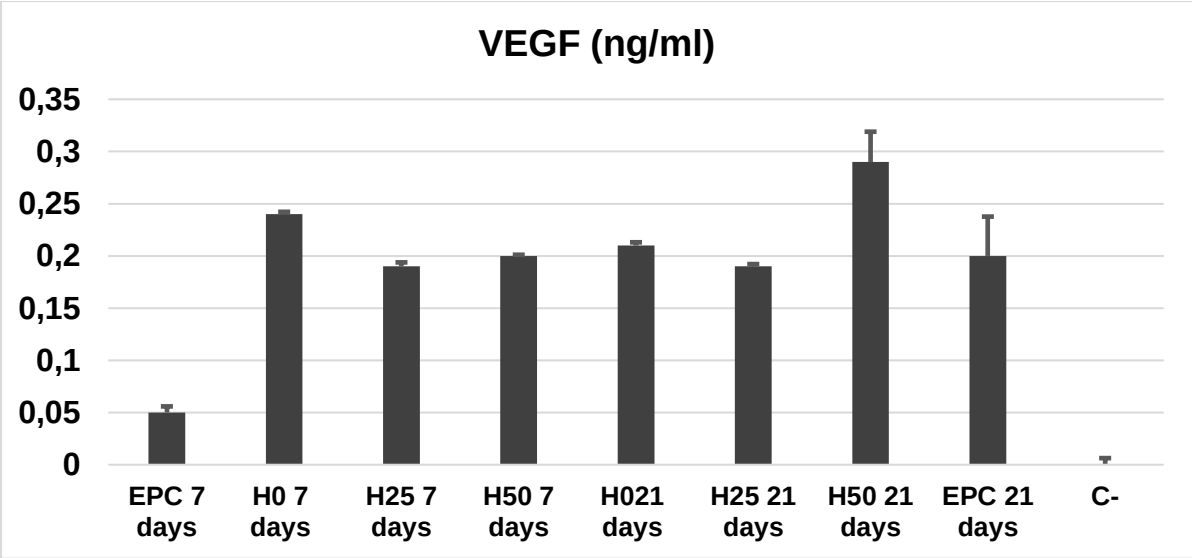


Fig. 5 VEGF concentration (ng/ml) in vascular constructions H0, H25 and H50, at 7 days and 21 days using ELISA assay

The results showed that in vascular constructions the level of VEGF is higher than in 2D system at 7 days. After 21 days of cultivation, the concentration of VEGF in vascular constructs H50 was 0.29 ng / ml, in H25 0.19 ng / ml and in H0 0.21 ng / ml comparable to EPCs raised in 2D system (0.2 ng / ml). Also, the detection of VEGF in the EPC cultures obtained from AFSC shows that the differentiation towards the endothelial line occurred (Fig. 5).

Nitric oxide (NO) is a molecular mediator of many physiological processes, including vasodilation, inflammation, thrombosis, immunity and neurotransmission. There are a number of methods for measuring NO in biological systems. One of these methods involves the use of the Griess diazotization reaction to detect spectrophotometrically the nitrite formed by the spontaneous oxidation of NO under physiological conditions. Detection and quantification of nitric oxide was performed with the Griess Reagent kit (Molecular Probe, ThermoFischer Scientific, USA). The sulphanilic acid is converted into a diazonium salt by reaction with nitrite in acid solution. The diazonium salt is then coupled to N-(1-naphthyl)-ethylenediamine, forming an azo dye that can be spectrophotometrically quantified based on its absorption at 548 nm.

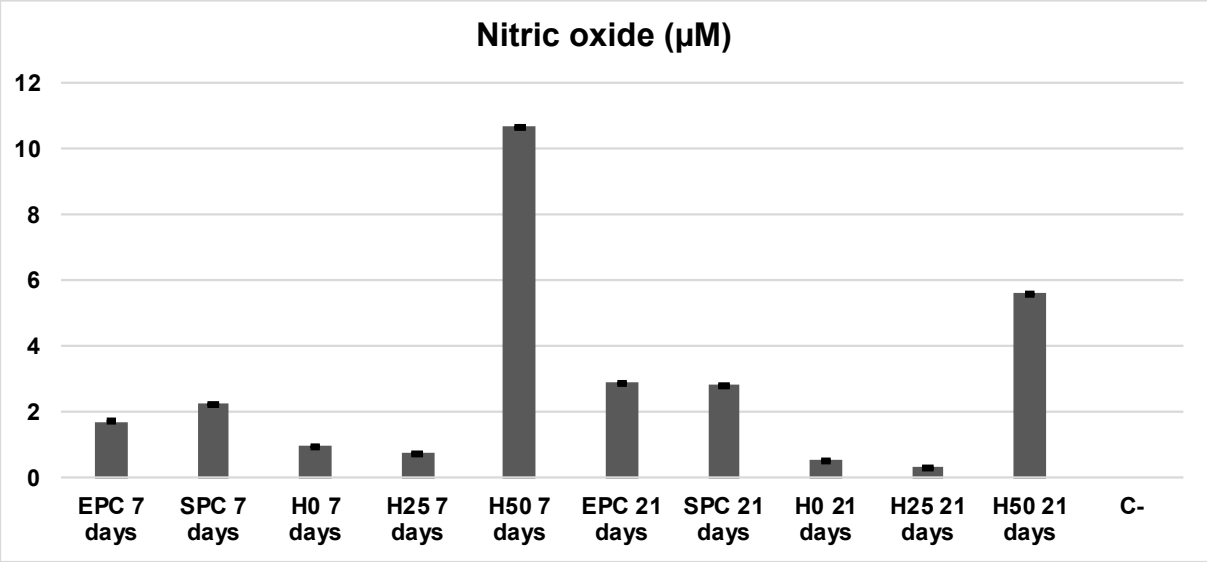


Fig. 6 Assessment of nitric oxide level in H0, H25 and H50 hydrogels, at 7 days and 21 days using the Griess test

Nitric oxide is synthesized by endothelial cells and plays a key role in maintaining vasorelaxation by exerting effects on smooth vascular muscle cells, whose contractile state defines vascular tone. NO produced in the cytosol of endothelial cells diffuses rapidly into adjacent smooth muscle cells, exerting paracrine effects by activating soluble guanylyl-cyclase to increase the synthesis of cyclic 3,5-guanosine monophosphate (cGMP) [9].

NO also decreases cytosolic Ca^{2+} concentration by inhibiting voltage-activated Ca^{2+} channels and activates protein kinases that phosphorylate proteins in the sarcoplasmic reticulum as well as Ca^{2+}-dependent potassium channels. Reduction of cytosolic Ca^{2+} concentration leads to inhibition of the calcium-calmodulin- light chains myosin-kinase complex in smooth muscle vascular cells, favouring vasorelaxation [10].

The obtained results showed that the differentiated cells from AFSC are endothelial progenitor cells because they express VEGF and nitric oxide. The highest amount of NO was identified in the H50 hydrogel reaching values of 10.7 μM and 5.65 μM at 7 days and 21 days respectively. (Fig. 6). EPCs grown in 2D system showed a NO level of 1.74 μM and 2.93 μM at 7 days and 21 days of cultivation (Fig. 6).

II.1 Analysis of the rearrangements of actin filaments and microtubules by immunofluorescence

To create a vascular structure, communication between different cell types is required. These interactions are accomplished through cell junctions, the extracellular matrix and the cytoskeleton. The adhesion of cells occurs through the interactions between the adhesion molecules such as CAMs ("cell adhesion molecules": integrins, selectins, cadherins), the transmembrane proteins located on the surface of the cell and the actin filaments, intermediate filaments and microtubules. Through these cell adhesion processes, cell migration and tissue formation are controlled [11,12]. Integrins are transmembrane receptors that facilitate communication between cells and the extracellular matrix (ECM). When ligand binds to integrins activate signal transmission pathways that mediate a number of cellular processes, such as cell cycle regulation, cytoskeleton organization, and the movement of new receptors to the cell membrane. Integrin ligands include fibronectin, vitronectin, collagen and laminin. Together with the signals from the receptors for soluble growth factors, such as VEGF, EGF, integrins contribute to cellular decisions on biological actions, such as adhesion, movement, death or differentiation. Cell attachment occurs through the formation of cell adhesion complexes, which consist of integrins and many cytoplasmic proteins, such as talin, vinculin, paxillin and act-actinin [13]. Cadherins are $Ca2^{+}$-dependent homophilic glycoproteins. Classical cadherins (endothelial, neural, and platelet) are concentrated at the level of cellular junctions, and they bind to the actin filament network through specific binding proteins called catenins. Selectins are a family of heterophilic proteins that are dependent on fucosylated carbohydrates for binding.

The three members of the family are E-selectin (endothelial), L-selectin (leukocyte) and P-selectin (thrombocyte). Selectins have many roles, but particularly important are those in the immune system, helping in the trafficking and adhesion of leukocytes [14].

Flow cytometry using fluorescent labelled specific antibodies (Gallios, Beckman-Coulter) was used to measure adhesion molecules and cellular interactions. Cells ($1x10^5$ cells / marker) were labelled with fluorochrome-conjugated primary antibodies (FITC - Fluorescein-isothiocyanate and PE - Phycoerythrin) for CD11b (αM integrin), CD29 (β1 integrin), CD31 (PECAM-1), CD44 (HCAM)), CD49e (α5 integrin), CD54 (ICAM-1), CD56 (NCAM), CD73, CD90 (Thy-1), CD105 (endoglin), CD106 (VCAM-1), CD117 (kit-c), CD133 (prominin), CD146 (MCAM), VEGFR1, FOS ALK, and HLA-ABC (Beckman-Coulter). AFSC, EPC and SPC were detached using acutase and washed in phosphate saline (PBS). The cells were then incubated with primary antibodies at room temperature and in the dark for 30 minutes. Further, the cells were washed and centrifuged at 400g, 10 min, in PBS with 1% BSA. For negative controls, cells were stained with isotype IgG antibodies (Beckman-Coulter). Flow cytometry data were analysed using Gallios software (Beckman-Coulter).

Table 1. Results obtained from AFSC and progenitor cells immunophenotyping by flow cytometry

No	MARKER	AFSC	EPC	SPC
1.	CD11b PE (integrin α_M)	4.2%	1.3%	0.08%
2.	CD29 PE (integrin β1)	28%	4%	0.2%
3.	CD31 FITC (PECAM-1)	6.5%	1.3%	0.45%
4.	CD44 FITC (HCAM)	100%	100%	100%
5.	CD49e PE (integrin α5)	100%	99%	94%
6.	CD54 FITC (ICAM-1)	12.5%	25%	5.7%
7.	CD56 PE (NCAM)	13%	38%	1.8%
8.	CD73 FITC	99%	90%	98.5%
9.	CD90 FITC (Thy-1)	97%	95%	100%
10.	CD105 FITC (endoglin)	95.5%	2.5%	1.7%
11.	CD106 PE (VCAM-1)	0%	1.5%	0.14%
12.	CD117 PE (c-kit)	5%	1.7%	0%
13.	CD133 APC (prominin)	5%	1%	0.29%
14.	CD146 PE (MCAM)	98%	70%	2.2%
15.	VEGFR1 PE	7%	3.5%	1.6%
16.	FOS ALK PE	7.5%	3%	3.5%
17.	HLA-ABC PE	100%	1.3%	100%

The results showed that EPC and SPC express CD44 (HCAM) at 100% and CD49e (α5 integrin) at 99% for EPC and 94% for SPC. EPC shows increased expression for the CD54 (25%), CD56 (38%), CD105 (95.5%) markers. Also, markers CD73, CD90, and CD146 are expressed by both EPC and SPC in percentages between 70-100% (Table 1).

II.2 Evaluation of cell morphology by scanning / transmission electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the behaviour of EPC and SPC in collagen and hyaluronic acid hydrogels. EPC and SPC were homogenized in H0, H25 and H50 hydrogels and bioprinted according to the blood vessel model created in BioCAD. At 7 days and 21 days, constructions were analysed by SEM. They were washed with PBS and fixed in 2.5% glutaraldehyde for 1 hour at room temperature. Then glutaraldehyde was removed and successive dehydration with ethanol (40%, 60%, 70%, 80%, 90% and 100%) was performed for 10 minutes each. The SEM analysis was performed with a HITACHI S2600N electron microscope, at 25 keV, on samples coated with a thin layer of silver.

The results showed that the cells adhere and distribute evenly in the collagen and hyaluronic acid hydrogels, which demonstrates the biocompatibility of these hydrogels.

The H0 hydrogel has a porous structure, forms large pores with a diameter between 80-150μM, H25 has smaller pores, between 40-120μM and H50 between 80-150 μM. In the presence of the H0 hydrogel, the cells have a fusiform morphology and emit filopods that allow the cells to interact with each other and with the collagen fibres. The H25 and H50 hydrogels allow a good growth of cells, forming a rich extracellular matrix which allows a good adhesion and the possibility of organizing in a tissue (Fig. 7).

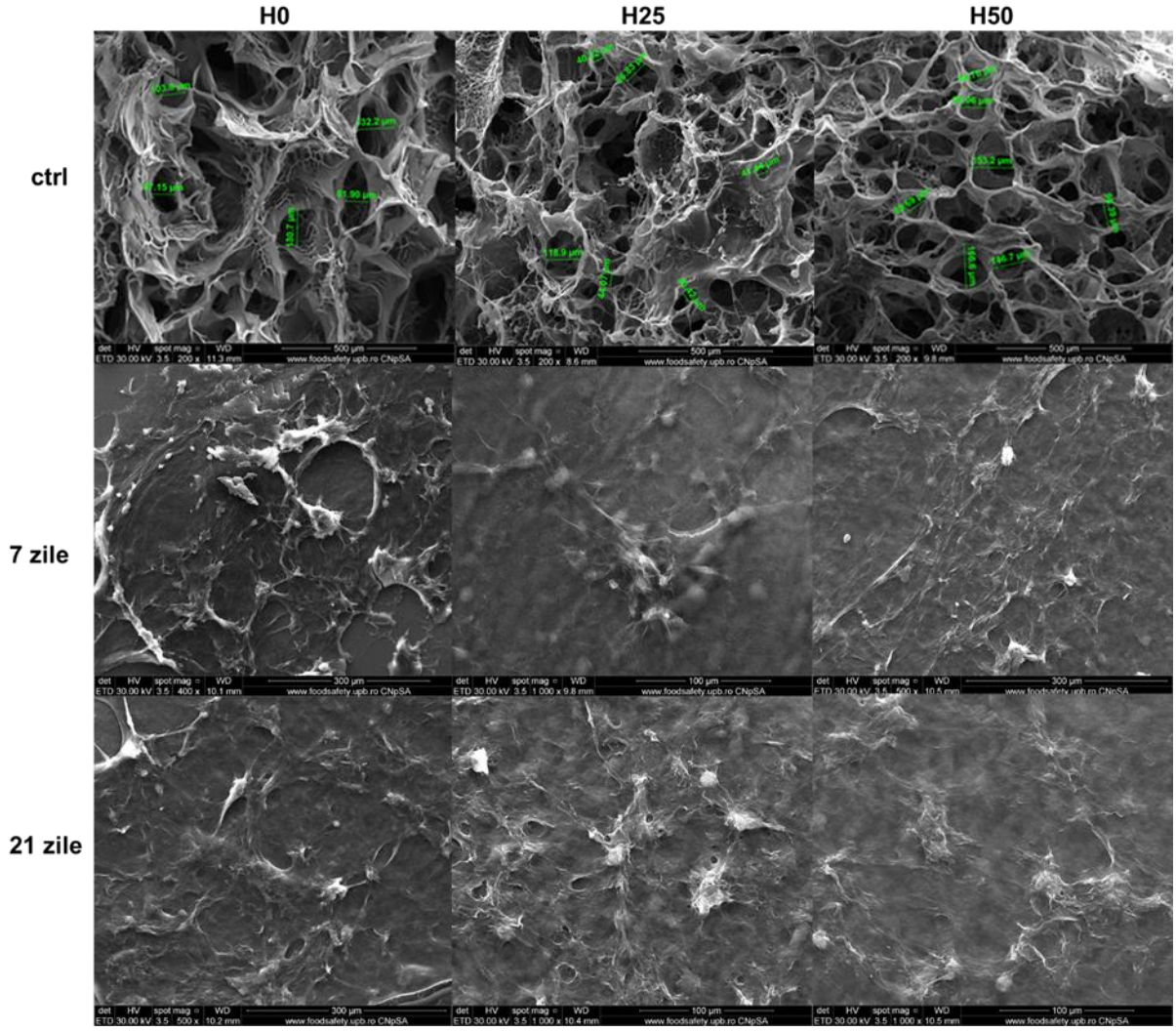


Fig. 7 Scanning electron microscopy images of H0, H25 and H50 hydrogels populated with EPC and SPC at 7 days and 21 days

In conclusion, the collagen-hyaluronic acid hydrogels studied have good biocompatibility. The obtained results showed that in the vascular structures created the cells are viable, proliferating and secreting factors necessary for the formation of blood vessels. The cells in the vascular structures' express markers specific to the endothelial and muscular cells, suggesting the possibility of vascular graft formation. The project will continue with a functional analysis of the vascular structures. Will be analysed functional properties of the vascular structures, by assessing the elasticity, the tensile strength and the contractility.

References

1. D. Mozaffarian, E. J. Benjamin, A. S. Go, D. K. Arnett, M. J. Blaha, M. Cushman, S. R. Das, S. de Ferranti, J. P. Despres, and H. J. Fullerton, Circulation 133(4), e38 (2016).

2. J. D. Lee, M. Srivastava, and J. Bonatti, Circ. J. 76(9), 2058 (2012)

3. B. C. Isenberg, C. Williams, and R. T. Tranquillo, Circ. Res. 98(1), 25 (2006).

4. L. Dall'Olmo, I. Zanusso, R. Di Liddo, T. Chioato, T. Bertalot, E. Guidi, and M. T. Conconi, Biomed. Res. Int. 2014, 685426

5. A. Hasan, A. Memic, N. Annabi, M. Hossain, A. Paul, M. R. Dokmeci, F. Dehghani, and A. Khademhosseini, Acta. Biomater. 10(1), 11 (2014).

6. Z. H. Syedain, M. L. Graham, T. B. Dunn, T. O'Brien, S. L. Johnson, R. J. Schumacher, and R. T. Tranquillo, Sci. Trans. Med. 9(414), eaan4209 (2017).

7. D. G. Seifu, A. Purnama, K. Mequanint, and D. Mantovani, Nat. Rev. Cardiol. 10(7), 410 (2013).

8. J. Jang, J. Y. Park, G. Gao, and D.-W. Cho, Biomaterials 156, 88 (2018).

9. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels în vascular smooth muscle. Nature. 1994; 368:850–853.

10. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. Physiol Rev. 1996;76(4):967–1003.

11. Gumbiner, Barry M. (1996). "Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis". Cell. 84 (3): 345–357.

12. Sumigray, Kaelyn D.; Lechler, Terry (2015). Cell Adhesion în Epidermal Development and Barrier Formation. Current Topics în Developmental Biology. 112. pp. 383–414.

13. Wilhelmsen K, Litjens SH, Sonnenberg A. Multiple functions of the integrin alpha6-beta4 în epidermal homeostasis and tumorigenesis. Molecular and Cellular Biology. 26 (8): 2877–86.

14. Cavallaro U, Christofori G (2004). "Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs în cancer". Nat. Rev. Cancer. 4 (2): 118–32.

Project Director

Florin Iordache PhD

Mass Spectrometry evidence for modified protein composition of pulmonary lipid rafts in experimental diabetes

Elena Uyy, Viorel-Iulian Suica, Raluca Maria Boteanu, Felicia Antohe, Maya Simionescu

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", Bucharest, Romania

Objective

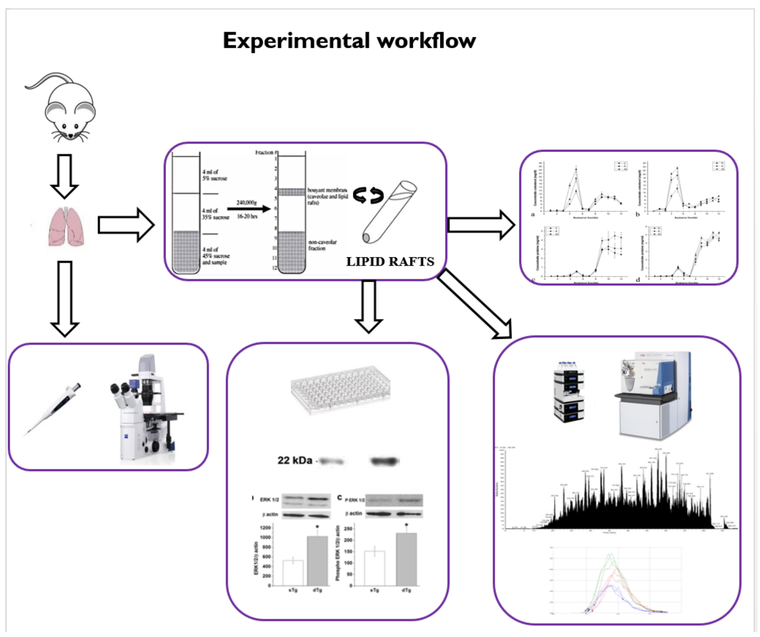
• Diabetes and the associated hyperglycemia affect pulmonary physiology and biochemistry inducing endothelial impairment, as the first step in lung vascular dysfunction. Lipid rafts are involved in signal transduction, cholesterol homeostasis and vesicular trafficking.

•The present study aimed to determine whether lipid raft proteome could be involved in the onset of diabetic state in the pulmonary tissue

•To document the effect of hyperglycemia on lung endothelial cells, we designed experiments on streptozotocin-induced diabetes (sD and their control WT) and on double transgenic diabetic mice (dTg and their control sTg) and investigated (1) the early morphological changes occurring in endothelial cells, (2) the ACE activity and cholesterol content of lipid rafts, and (3) relative protein quantification.

Material and methods

The lungs were harvested, homogenized and lipid rafts, a membrane enriched fraction, were isolated by sucrose gradient ultracentrifugation. Biochemical assays and LC-MS/MS analysis were performed on detergent resistant membrane (lipid rafts) microdomains isolated from the lungs of diabetic and non-diabetic mice. Also, the lungs were investigated by electron microscopy (see the experimental flow design)



Results

CHARACTERIZATION OF ANIMALS

The animals (sD, dTg, WT, sTg) exhibited variations in the body weight and blood glycaemia. The diabetics (sD and dTg) mice lost weight, were short of energy and appetite, and reached pathological blood glucose values. The WT and sTg animals maintained or even gained weight, while presenting a normal blood glucose level (table 1).

Table 1
Characteristics of diabetic and controls mice.

Mice type	WT	sD	sTg	dTg
Body weight (g)	36 ± 1.8	26.83 ± 0.5	25 ± 0.5	16 ± 0.5
Blood glucose (mg/dl)	90 ± 15	265 ± 20	110 ± 1.5	430 ± 2.5

Data are expressed as mean ± SEM.

Electron microscopy results showed a well-developed synthesis apparatus in diabetes, demonstrating high metabolic activity (Fig.3)

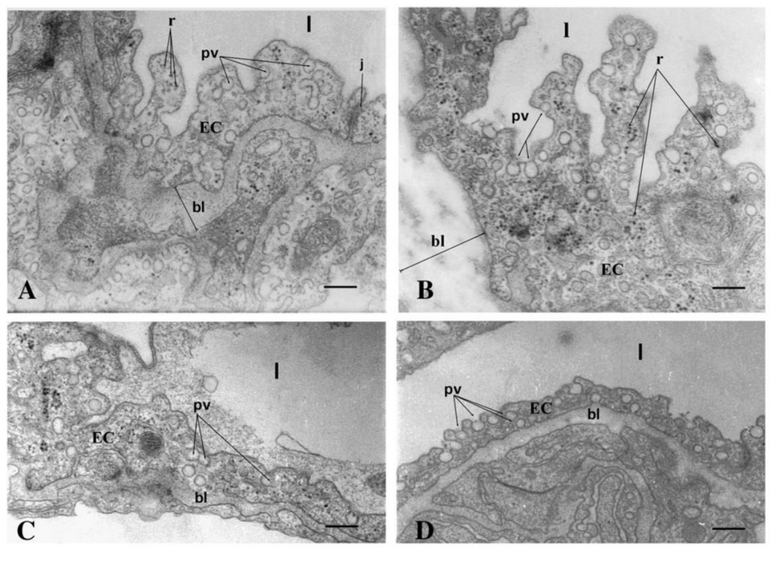


Figure 1. *Note the presence of a highly convoluted apical plasmalemma, the noticeably increased number of plasmalemmal vesicles (caveolae) and ribosomes (r), and the hyperplasic basal lamina (bl) in the double transgenic mice (A, B) vs. (C) single transgenic (D) wild type control mice. pv: plasmalemmal vesicles; I: capillary lumen; EC: endothelial cell; j: junction. Bars= 200 nm.*

Results

•BIOCHEMICAL AND MASS SPECTROMETRIC CHARACTERIZATION OF LIPID RAFTS

• ACE activity and cholesterol concentrations in the fractions obtained after ultracentrifugation of lung homogenate

Tissues from streptozotocin-induced diabetic mice (sD), wild type mice (WT), double transgenic diabetic mice (dTg) and single-transgenic non-diabetic controls (sTg) were homogenized in a buffer containing Triton X-100 and separated on sucrose gradient as describe in materials and methods. ACE enzymatic activity (Fig.2) and cholesterol concentrations (Fig. 3) was measured in the fractions collected after ultracentrifugation of lung homogenate. Also, caveolin-1 expression (Fig. 3: A and B) was investigated by Western blots and densitometric analysis in fraction 4-6 from controls mice (WT) vs. streptozotocin–induced diabetic mice (sD) and single transgenic mice (sTg) vs. double transgenic mice (dTg).

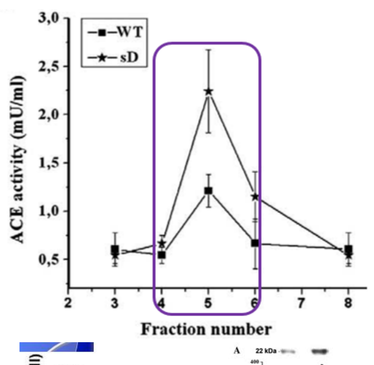


Figure 2 *- ACE enzymatic activity measured in the sucrose gradient separated lung fractions. Note that the ACE activity was 2 times higher in diabetic condition than in the control probes in the lipid rafts enriched membrane fractions 4-6.*

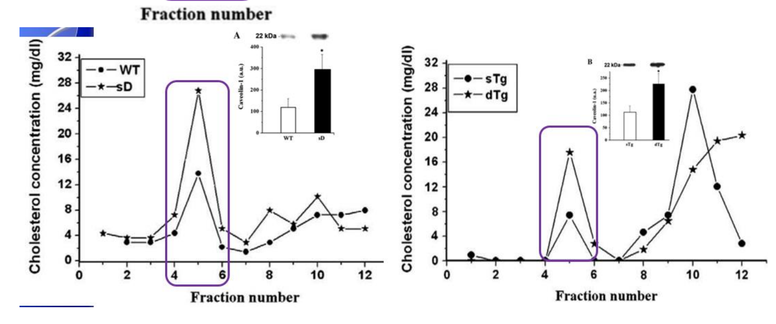


Figure 3 *. The cholesterol concentrations assayed in the 12 collected fractions revealed that in all cases fractions 4-6 (the lipid raft-enriched membrane fraction) present high cholesterol concentration. Note the significantly increased level of cholesterol in diabetic mice.*

• Global Comparative Shotgun Proteomic Analysis

LC-MS/MS experiments performed on lipid rafts enriched membrane fractions isolated from dTg and sTg lung tissue led to the identification of a large number of proteins (1748 proteins) (Fig. 4A)

The relative quantification of the proteins evidenced a total of 88 proteins showing up-regulated abundance (1.5 fold increase of dTg/sTg ratio) while 90 proteins presented down-regulated expressions (0.67 fold lower of dTg/sTg ratio) (Fig. 4C). The post-filtering PCA revealed the excellent differentiation of the dTg and sTg groups. The Protein Center bioinformatics platform was used to identify relevant biological events from the complex data sets. 13 inter-relation maps were found to be over-represented (FDR p value < 0.05 for dTg/sTg) in lipid rafts-enriched membrane fraction isolated from lung tissue (Fig. 4D)

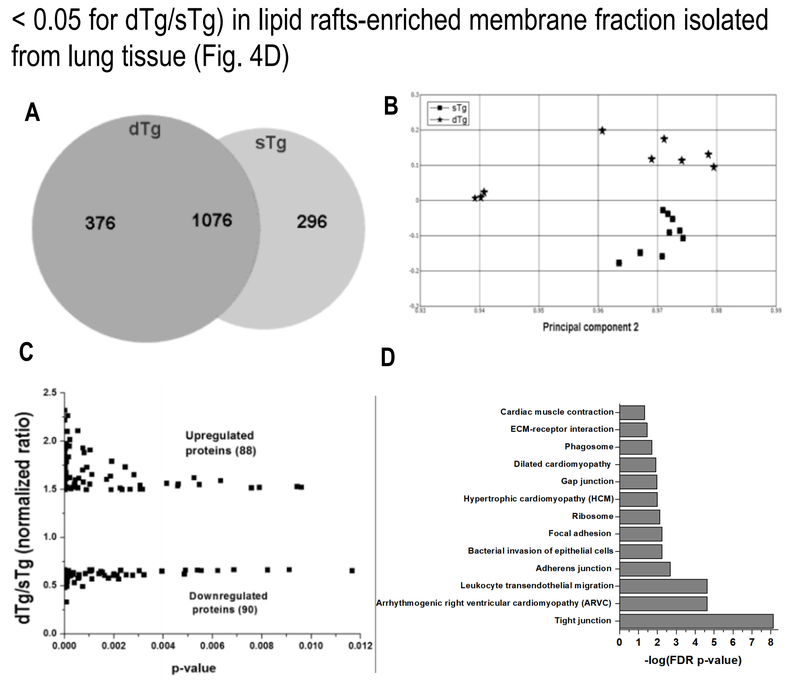


Figure 4. *Characterization of isolated DRMs. (a) Venn diagram of the MS identified proteins in DRMs (fractions 4-6) representing merged experiments from all the technical and biological replicates of the diabetic (dTg) versus control tissue (sTg). (b) Principal Component Analysis of filtered peptides isolated from dTg versus their sTg mice showing the biological significant differences between the two groups. d) The up- and down-regulated ribosomal proteins normalized to the total ion current per MS experiment shown as dTg/sTg ratio. (D)* Over-represented KEGG pathway maps found to be significant (FDR p value < 0.05) statistical over-representation against the mouse database.

Results

- **Ribosomal regulatory proteins in diabetes**.

The list of differentially abundant proteins was correlated with KEGG databases and the Ribosome signaling pathway was found to be systematically over-represented (FDR p-value = 2.66E-4). Within this pathway, the abundance of eight ribosomal proteins was found to be altered in dTg animals, that were statistically up or down regulated in dTg samples versus sTg (Fig. 5B).

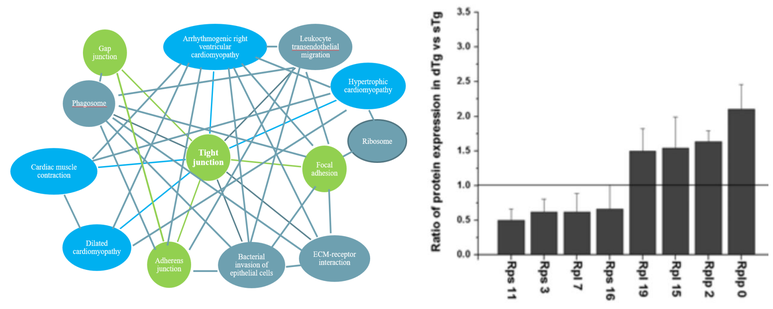


Figure 5*. A. Analysis of pathway crosstalk based on protein-protein interaction networks. The circles indicate the pathways and the lines indicate the links between any two pathways. B. Expression of quantified ribosomal proteins shown as normalized ratio of dTg/sTg.*

- **Mass Spectrometry quantification of alarmins abundance in diabetes**

LC-MS/MS analysis revealed that hyperglycemia has a modulatory effect on the expression of alarmin proteins that co-fractionated with lipid rafts.

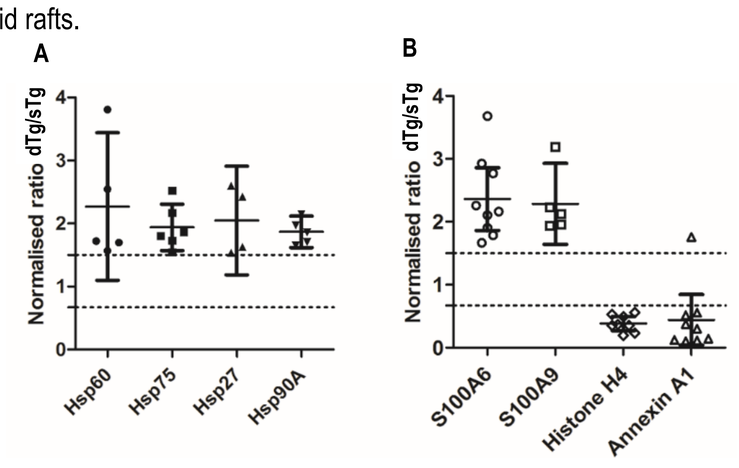


Figure 6. Differential abundance of alarmins in lipid raft enriched membrane isolated from genetically induced diabetic mice (dTg) relative to the control group (sTg). Four members of the HSP (A) and two of the S100 (B) families were clearly more abundant in the diabetic animals than in the control group. Note the statistically significant decreased abundance of the Histone H4 and Annexin A1 proteins (B). The means of the relative ratio of diabetic (dTg) over control (sTg) were calculated in GraphPad Prism with 95% confidence intervals.

Discussion

In diabetic lung, the endothelial cells exhibit both structural and biochemical modifications accompanied by enhanced cholesterol content and ACE enzymatic activity. In adition, mass spectrometry experiments showed a modified expression of caveolin-1, alarmins, ribosomal and junctions proteins associated with lipid rafts. This may point out toward a possible novel regulatory pathways in the mechanism of microangiopathy installation modulated by the lipid rafts composition in the diabetic lung.

Acknowledgements

•We thank Radu Dorel Lucian, M.D., Ph.D., Associate Professor from "Cantacuzino" National Institute of Research and Development for Microbiology and Immunology, Bucharest, Romania for the transgenic-induced diabetes mice, Madalina Oppermann, Ph.D, for valuable collaboration. We thank Dr. D. Popov for the streptozotocin-induced diabetes mice, Mrs. Mariana Pascu for excellent technical assistance and Mrs. Misici Marilena for tissue sectioning. The present work was supported by the Romanian Academy and Ministry of Research and Innovation Grant UEFISCDI no.41/2018

Contact

PhD. Elena Uyy

Telephone: +4021 319 27 37/ 232

E-mail: elena.uyy@icbp.ro

PROTEOMICS DEPARTMENT
ICBP N. SIMIONESCU

EXPLORATION OF MECHANISMS LEADING TO PLAQUE INSTABILITY IN A RABBIT ATHEROSCLEROTIC MODEL. PRELIMINARY DATA

Luminita Ivan[1], Elena Uyy[1], Raluca M Boteanu[1], Viorel I Suica[1], Cristin Coman[2], Sigrid Berg[3], Rune Hansen[3], Felicia Antohe[1]

PROTEOMICS DEPARTMENT
ICBP N. SIMIONESCU

1. Institute of Cellular Biology and Pathology "N. Simionescu", Romanian Academy, Bucharest, Romania
2. INCDMM "Cantacuzino", Bucharest, Romania
3.SINTEF Technology and Society, Trondheim, Norway

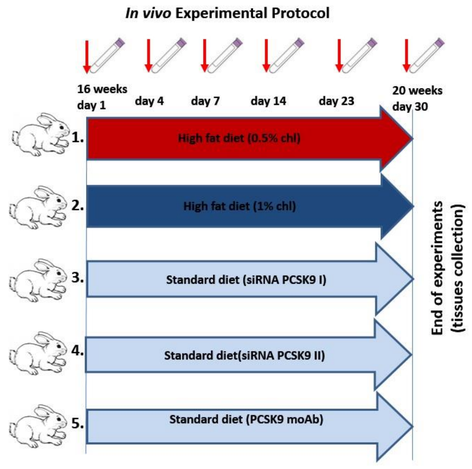
INTRODUCTION

Background. Atherosclerosis is a lipoprotein-driven disease that leads to plaque formation at specific sites of the arterial tree through intimal inflammation, fibrosis, necrosis, and calcification. Sometimes such plaques may suddenly cause life-threatening coronary thrombosis clinically described as acute coronary syndrome.

Hypothesis. An atherosclerotic rabbit model, with a lipoprotein metabolism similar to the human patient, have been proposed to explore the mechanisms leading to plaque instability. We expect to identify an unambiguous alarmin expression pattern, associated to specific atherogenic signalling pathways that may explain the residual risk of cardiovascular-related events and associated mortality.

Aim. The project will explore the plaque instability and the early signs of risks and/or protective factors in coronary disease by using an experimental design comprising both the classical pharmacology (statin administration) and the newest generation of molecular biology approaches (RNA silencing or biological active agents such as PCSK9 antibodies). In preliminary studies the hypercholesterolemic food concentration and treatment to be used was evaluated.

METHODS

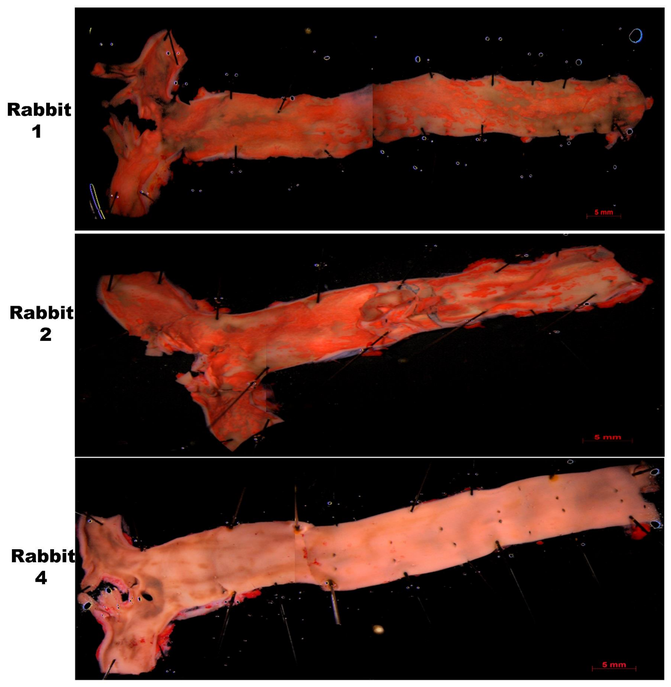


A schematic of experimental design

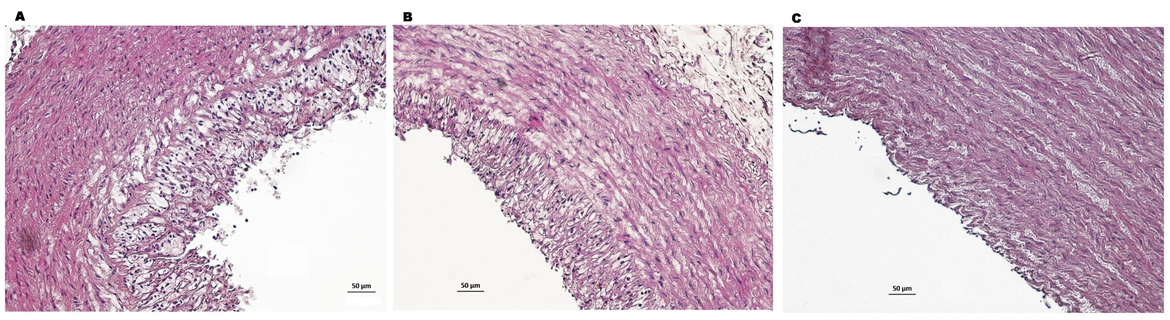
Adult male New Zeeland White rabbits (16 weeks-old) were randomly split into 5 groups: two animals were fed a diet containing either 0.5% or 1% high cholesterol diet and three animals were fed a standard diet together with inhibition of PCSK9 for 4 weeks. The inhibition of PCSK9 were obtained either with siRNA (molecule I or II) or using monoclonal antibodies against PCSK9 (Evolocumab, Repatha, AMGEN).

RESULTS

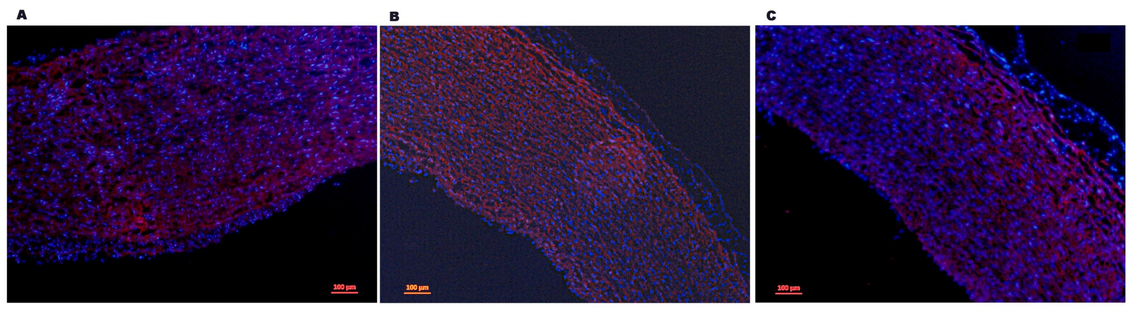
Hyperlipidemic diet induces atherosclerotic plaque progression



The presence of atherosclerotic lesions were assessed by Oil Red O staining. Representative images of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits (rabbit 1 and rabbit 2), comparative with rabbit 4 that were fed a standard diet.

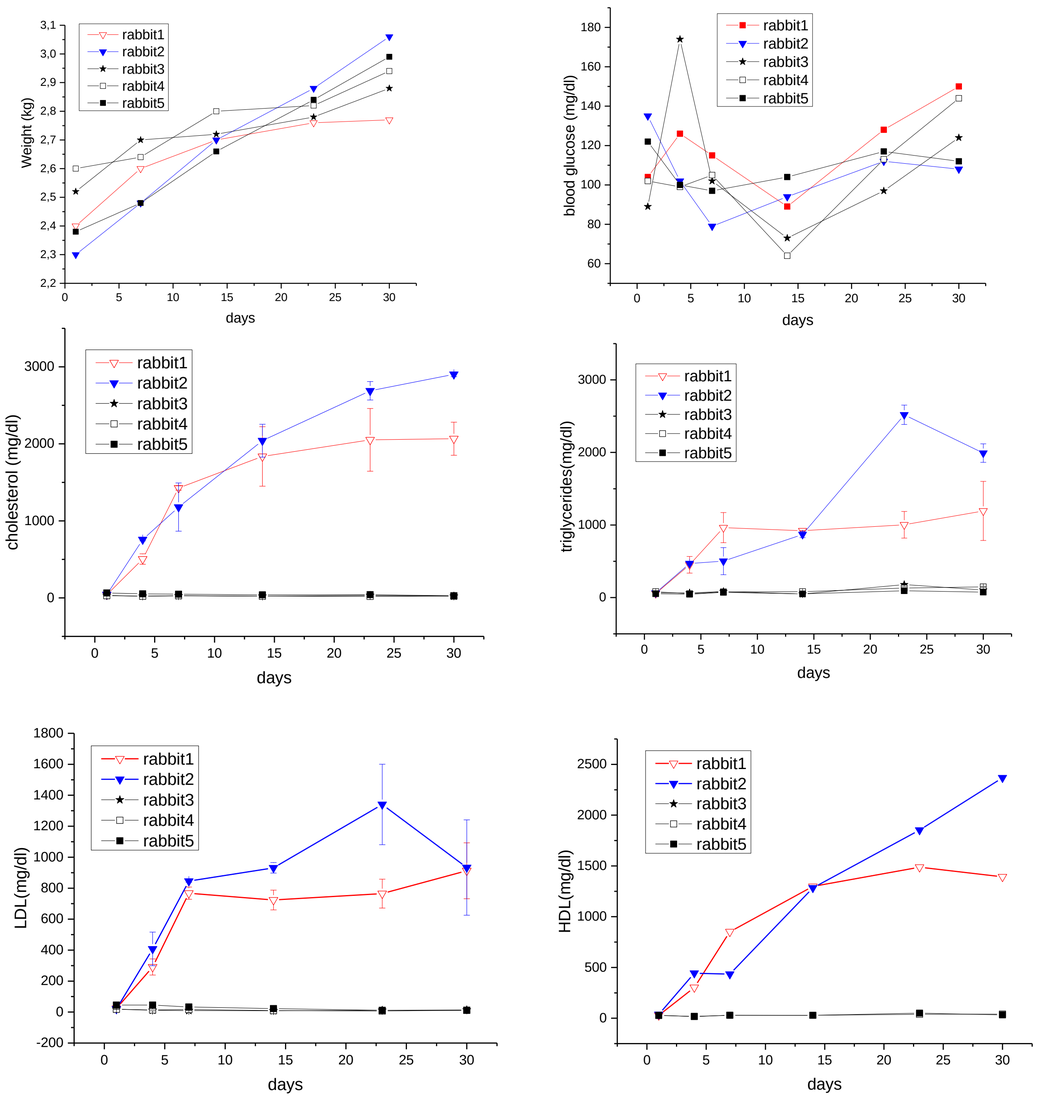


Microscopically atherosclerotic lesions. The presence of atherosclerotic lesions were assessed by hematoxylin and eosin staining, that is essential to evaluate the quality of the lesions (A, B) such as cellular and extracellular matrix component features and plaque vulnerability.

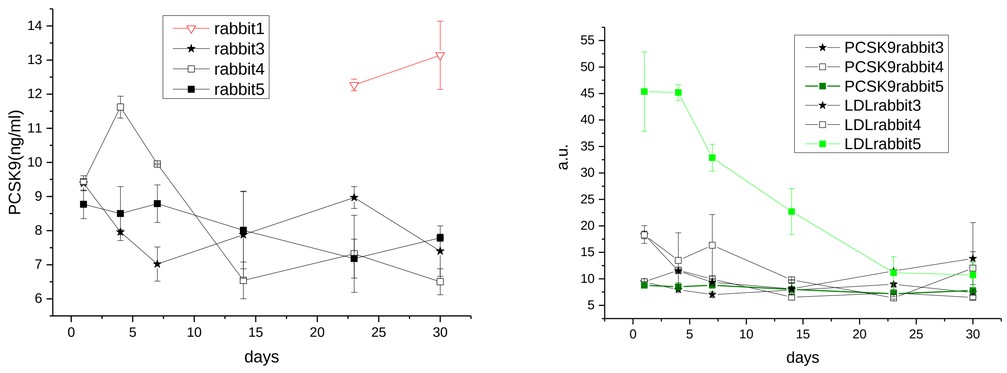


Immunohistochemical investigations of the lesions. In the present study, we found that irrespective of the cholesterol concentration diet the atherosclerotic plaques (A, B) higher expression of α-smooth muscle actin were detected than in the animals fed a standard diet (C).

Hyperlipidemic diet induces a significant increase in lipid parameters in the plasma



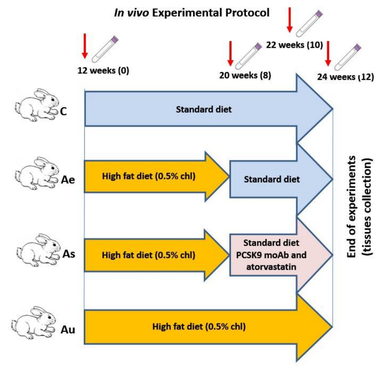
Body weight, blood glucose and plasma lipid profiles. Total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL), and triglyceride levels were measured by using Dialab kits.



Levels of PCSK9 protein in plasma samples were detected by ELISA kit. The administration of anti PCSK9 antibody showed a decrease of the plasma PCSK9 protein and LDL in the treated animals.

CONCLUSIONS

The preliminary results suggest that hypercholesterolemic diet induces atherosclerotic plaque progression in rabbit model and for more advanced lesions, the 0.5% cholesterol diet will be extended to 12 weeks. The inhibition with anti PCSK9 demonstrated to be functioning in the decreasing of LDL plasma and could be successfully used in the proposed study.



Acknowledgments. The work was supported by the Romanian Academy and Ministry of Research and Innovation grant UEFISCI no. 41/2018.

Prezentare Proiect CARDIOPRO

Institutul de Biologie si Patologie Celulara “Nicolae Simionescu” (IBPC-NS) este un centru de cercetare fundamentala al Academiei Romane, cu experienta de 33 de ani in studiul la nivel celular si molecular al sistemului cardiovascular in conditii normale si patologice, cu precadere a maladiilor majore care afecteaza grav societatea moderna: ateroscleroza, diabet, obezitate si disfunctiile neurovasculare.

Scopul proiectului:

Extinderea si modernizarea infrastructurii de cercetare in domeniul cardio-diabetologiei in vederea accelerarii rezultatelor stiintifice si a transferului lor din laborator in clinica - medicina translationala.

Aceasta va contribui la cresterea capacitatii de cercetare a echipei IBPC-NS, cu consecinte in profilaxia si imbunatatirea tratamentului bolilor cardiovasculare cat si asupra nivelului de competitivitate a stiintei Românesti si integrarea in Aria Europeana de Cercetare.

Obiectivele proiectului:

1) **Cresterea calitatii si competitivitatii cercetarii** prin achizitionarea de echipamente noi in vederea introducerii tehnologiilor moderne, competitive pe plan European. Dotarea laboratoarelor a fost facuta astfel incat sa sustina noi directii de cercetare in cardio-diabetologie: lipidomica, proteomica, genomica-transcriptomica si terapie moleculara, patofiziologie si farmacologie, biopatologia si terapia inflamatiei si medicina regenerativa.

2) **Promovarea tehnologiilor de virf** in cercetarea orientata pentru prevenirea si tratarea maladiilor cardiovasculare si diabezitate, cercetare menită să contribuie la modernizarea actului medical si prin aceasta la scaderea incidentei grave a mortalitatii prin boli cardiovasculare.

3) **Integrarea IBPC-NS in Aria Europeana de Cercetare** prin intarirea relatiilor de colaborare existente, nationale si internationale.

4) **Valorificarea integrala si extinderea potentialului uman din IBPC-NS**: atragerea de tineri cercetatori, crearea de noi locuri de munca, reducerea „brain-drain”.

5) **Dezvoltarea institutională** bazata pe strategia de dezvoltare existentă a institutului şi elaborarea unui plan de actiuni pe termen scurt, mediu si lung; profesionalizarea managementului cercetării şi consolidării rolului ştiinței în societate.

Componente principale proiect:

A. Reabilitarea constructiilor si instalatiilor

Reabilitarea structurala a cladirii de laboratoare, termoizolarea cladirii pentru imbunatatirea performantei energetice, modernizarea suprafetelor construite, a tuturor instalatiilor functionale (ventilatii, climatizari, termice, sanitare, electrice curenti tari si slabi) care sa asigure conditiile unei functionări optime a echipamentelor si aparaturii de cercetare, precum si recompartimentari ce au condus la extinderea spatiilor dedicate cercetarii;

B. Dotari cu echipamente de C-D de inalta performanta

Achizitia a peste 150 echipamente si aparate de C-D, si alte dotari de înaltă performanță, la nivelul standardelor de cercetare ale UE, care au intrat in dotarea celor 13 laboratoare noi infiintate si a laboratoarelor existente, in sprijinul noilor directii de cercetare in cardio-diabetologie:

⇨ *Lipidomica*

Sistem complet gaz cromatograf cu autoinjector şi detectori, cuplat cu spectrometru de masă - Agilent Technologies

Cromatograf lichid de înaltă performanță (UHPLC) cu sistem de injecție a probei şi detectori multimod - Agilent Technologies

Sistem pentru cromatografie lichidă rapidă pentru proteine (FPLC), cu detector UV şi colector de fracțiuni - GE Healthcare

Spectrofluorimetru - ABL&E-Jasco

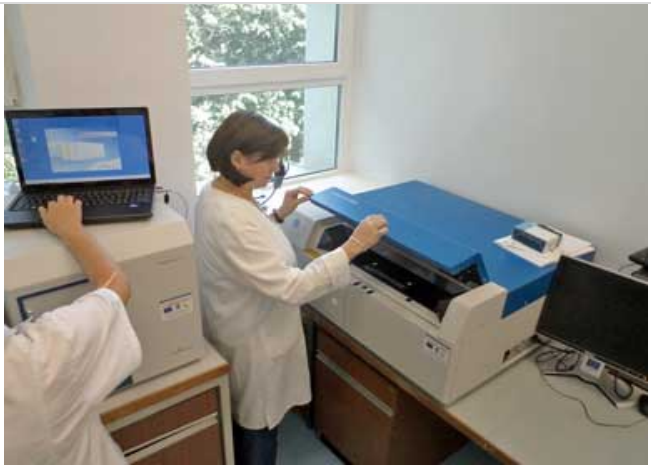
Sistem Real-Time PCR ViiA7 - Applied Biosystems

Aparat pentru preluare imagini in flluorescenta, luminiscenta, UV si vizibil LAS-4000 - GE Healthcare

⇨ Proteomica

Sistem spectrometrie de masa - Thermo Scientific

Spectrofotometru de mare performanta cu capabilitati de fluorescenta si luminiscenta - BMG Labtech



Typhoon FLA 9500 high performance variable mode laser scanner - GE Healthcare

Sistem de nanocromatografie de lichide Easy Nano LC II, Thermo Scientific

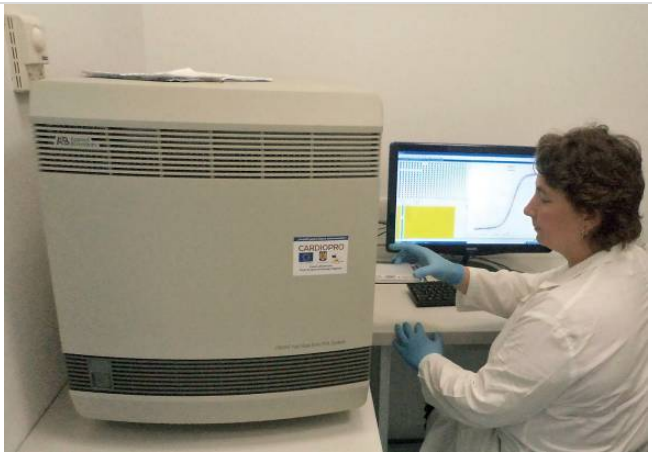
Sistem automat de excizare spoturi - Bio-Rad

Sisteme de mare performanta pentru electroforeza bidimensionala - GE Healthcare / Bio-Rad

⇨ Genomica-transcriptomica si terapie moleculara

Aparat pentru pirosecventiere - Qiagen

Statie de pipetare - Qiagen



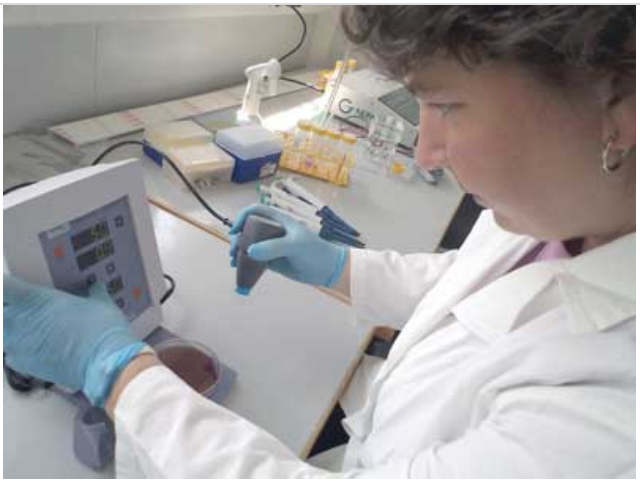
Real Time PCR - Applied Biosystems

Real-time PCR thermocycler LightCycler 480II- Roche

Microscop optic inversat de fluorescenta, Carl Zeiss

Sonicator Bioruptor Plus - Diagenode

Aparat electroporare in vitro si in vivo - NepaGene

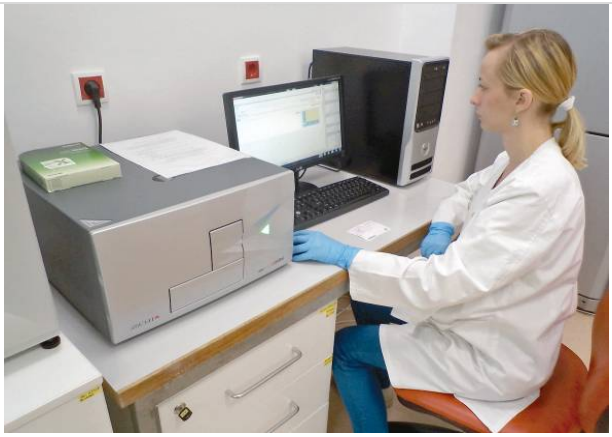


Aparat sonoporare - Sonidel

⇨ *Patofiziologie si farmacologie*

Sistem microdisectie cu laser Zeiss

Echipament complex pentru miografie izometrica - DMT



Spectrofotometru pentru microplaci - TECAN

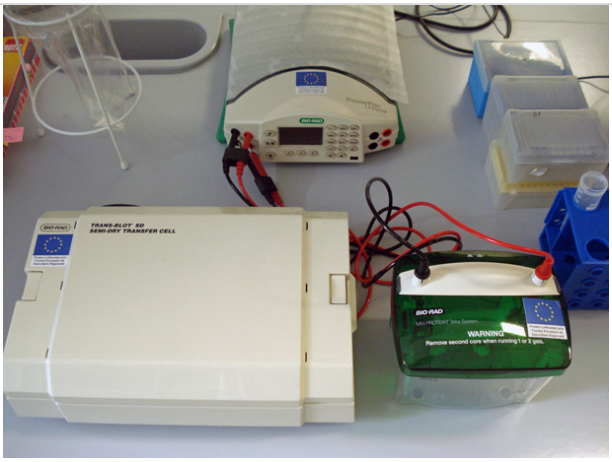
Echipament de PCR conventional (thermocycler) - Applied Biosystems

⇨ *Biopatologia si terapia inflamatiei*

Sistem adeziune in flux laminar - OLYMPUS

Hote cu flux laminar - Euroclone

Centrifuga – Beckman Coulter



Electroforeza, Bio-Rad

⇨ *Medicina regenerativa in terapii celulare*

Citometru de flux - Beckman Coulter

Analizor automat de biochimie, Randox

Microscop inversat - Nikon

Sistem Millar pentru masurarea functiei cardiace prin determinarea concomitenta a presiunii si volumului cardiac

Microscop de fluorescenta, inversat, de cercetare - Zeiss

Vibratom automat - Leica

La acestea adaugandu-se dotarile pentru facilitatile comune departamentelor de cercetare din Institut:

⇨ *IMAGISTICA*

Ultramicrotom EMUC7 cu sistem de sectionare la temperatura joasa EMFC7 - Leica

Sistem confocal - Leica

Ecograf pentru animale mici Vevo 2000- Visualsonic

Sistem tomograf pentru animale mici de laborator IVIS SPECTRUM - Caliper

⇨ LABORATORUL CENTRAL CULTURI CELULARE

Camere curate cu diferite clase de curatenie

⇨ PLATFORMA DE MODELARE EXPERIMENTALA

Rack-uri ventilate cu custi pentru animale mici de laborator, Allentown

Hota biologica de securitate si transfer de animale – ALLENTOWN,
Izolator de transfer mobil 2 manusi - EuroBioConcept

C. Intarirea capacitatii administrative si institutionale

Aceasta componenta a avut in vedere:

- definirea nivelului si rolului Institutului ca actor pe piața internațională a cunoaşterii şi mobilizarea resurselor Institutului de colaborare cu firmele în domeniu;
- introducerea si aplicarea conceptelor privind managementul cercetării;
- practici si metode de valorificare a potentialului de colaborare si participare la rețele naționale şi internaționale, inclusiv acces la instrumente financiare, care să asigure masa critică şi obținerea de rezultate valoroase ale cercetarii la nivel internațional;
- continua evaluare a performanței cercetării.

A fost elaborata Strategia privind dezvoltarea institutionala a IBPC-NS pentru perioada 2012-2015

ACADEMIA ROMÂNĂ

INSTITUTUL DE BIOLOGIE SI PATOLOGIE CELULARA
"NICOLAE SIMIONESCU"

PROGRAM

"O călătorie fascinantă de 40 de ani pentru descoperirea secretelor celulei în beneficiul sănătății omului"

"An incredible 40-year journey to uncover cell's secrets for the benefit of human health"

IBPC
NICOLAE SIMIONESCU

SIMPOZION ANIVERSAR
bucuresti 19-20 septembrie 2019

Felicia ANTOHE
Jean ASKENASY
Nadir ASKENAZY
Angello AZZI
Alexandrina BURLACU
Elena BUTOI
Manuela CĂLIN
Ana-Maria CATRINA
Radu DEAC
Anca DOBRIAN
Ionel DROC
Mădălina DUMITRESCU
Mădălina FENYO
Alexandru FILLIPI
Marton FOGARASI
Werner FRANKE
Anca GAFENCU
Zorina GALIS
Adriana GEORGESCU
Mircea IVAN
Dimitris KARDASSIS
Cristina LUPU
Florea LUPU
Ileana MÂNDUȚEANU
Adrian MANEA
Irit MEIVAR LEVY
Șerban MOROȘAN
Ioan-Aurel POP
Irinel POPESCU
Doina POPOV
Mihai Bogdan PREDA
Alexandru ȘCHIOPU
Sam SILVERSTEIN
Anca SIMA
Agneta SIMIONESCU
Dan SIMIONESCU
Maya SIMIONESCU
Violeta TRUȘCĂ
Ana VĂCARU
Andrei VĂCARU

ORGANIZATORI ȘI SPONSORI / ORGANIZERS AND SPONSORS

ORGANIZAT DE / ORGANIZED BY:

Institutul de Biologie si Patologie Celulară "N. Simionescu"
Centru de excelență al Comunității Europene

SUB AUSPICIILE / UNDER THE AEGIS OF:

Academiei Române

CU CONTRIBUȚIA SPONSORILOR/ WITH THE CONTRIBUTION OF:

SPONSORI "PLATINUM":

- **FUNDAȚIA FAMILIEI "MENACHEM H. ELIAS"**

ComputerLand ROMÂNIA
Business to business. Person to person.

SPONSORI "GOLD":

BIOMEDICA

Dialab Solutions

SPONSORI "SILVER":

- **FUNDAȚIA PATRIMONIU A ACADEMIEI ROMÂNE**

ANTISEL

REDOX
RESEARCH & ANALYTIC

novaintermed

MERCK

BUN VENIT,

dragi Colegi și Prieteni ai Institutului,

În numele echipei noastre este o plăcere și onoare pentru mine să vă spun:
Bun Venit la această Sărbătoare a IBPC-NS pe care o considerăm o Sărbătoare a Cercetării Românești!

La 40 de ani, fie om, fie Instituție, trebuie să privească deopotrivă, în urmă, în prezent și în viitor. Asta am încercat și noi. Am scos o carte cu amintiri din trecut, am tipărit o carte cu realizări prezente și speranțe de viitor și am organizat acest simpozion în care am invitat Prietenii Institutului, între care, unii prezenți, alții absenți au avut un rol esențial în viața noastră științifică și personală.

Omagiul nostru pentru cei care nu sunt azi cu noi.

Întâlnirea aceasta este o celebrare a șansei noastre de a explora biologia Celulei – pentru că Celula este Viață, este un Univers redus la esență.
Programul este remarcabil și conferențiarii excelenți.

Vă mulțumim că ne sunteți azi alături și sperăm ca acest eveniment să arate încă o dată coeziunea și puternicele legături umane care se pot face prin Știință și pentru Știință.

WELCOME,

dear Colleagues and Friends of our Institute,
On behalf of our team it is a pleasure and honor for me to:
Welcome you to the ICBP-NS Anniversary that we consider as a celebration of Romanian research!

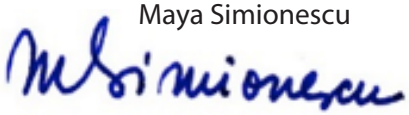
At the age of 40, either a human being or an Institution, must look back, at present, and at the future.
That's what we tried. We brought out a book with memories, we printed a book with present achievements and future hopes and we organized this Anniversary Symposium in which we invited the Friends of the Institute, among which, some present, others absent played an essential role in our scientific and personal life.

Our tribute to those who are not with us today.

This meeting is a celebration of our chance to explore the biology of the Cell - because the Cell is Life, the Cell is a Universe reduced to its essence.
The program of this symposium is excellent and the lecturers outstanding.
Thank you for joining us today and we hope that this event will once again show the cohesion and strong human connections that can be made through Science and for Science.

Bine ați venit în România!/ Welcome to Romania!
Bine ați venit în IBPC!/ Welcome to ICBP!

Maya Simionescu



Co-fondator împreună cu Nicolae Simionescu și Director al IBPC "N. Simionescu"

/ Co-founder with Nicolae Simionescu and / Director of ICBPC "N. Simionescu "

JOI, 19 SEPTEMBRIE 2019 - Aula Academiei Române

9.30 - 10.15 Deschiderea Simpozionului/ Opening Remarks
Acad. Ioan -Aurel Pop – Președintele Academiei Române
Acad. Maya Simionescu–Director al IBPC "N. Simionescu"

10.15 -11.30 Evocări/ "On the memory lane"
CHAIRS: Maya Simionescu, Sam Silverstein
Prof Sam Silverstein – Columbia University Medical Center, USA: "Maya and Nicolae Simionescu, George Palade, and the founding of ICBP"
Prof. Irinel Popescu – Președintele Academiei de Ştiinţe Medicale
Prof. Radu Deac – Vicepreședintele Academiei de Ştiinţe Medicale
Prof. Jean Askenasy – Tel-Aviv University, Israel, Membru de onoare al Academiei Române
Prof. Werner Franke – German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany: "Those were the years of key importance in the history of science: 1979 – Molecules meet Methods"
Acad. Doina Popov – IBPC "N. Simionescu"
Dr. Anca Dobrian – Eastern Virginia Medical School, USA: "Tell them of battles, kings, elephants and, endothelial cells"
Prof. Angello Azzi – Tufts University, USA: "UNESCO-MCBN- ICPB: Acronyms for a better science"
Dr. Florea Lupu – Universitatea din Oklahoma, USA

11.30-12:00: FOTOGRAFIE DE GRUP – PAUZĂ DE CAFEA/ GROUP PICTURE - COFFEE BREAK

12:00 -13:45 "Descoperiri, noutăţi în laboratoarele IBPC-NS"/ "Scientific discoveries, latest advances of ICBP laboratories"
CHAIRS: Doina Popov, Jean Askenasy
12.00-12.15 Anca Sima: "Lipidomics, a pioneering domain in ICBP"
12.15-12.30 Ileana Mânduțeanu: "Vascular and valvular inflammation in atherosclerosis and diabetes: new mechanisms and targets for nanobiotherapies"
12.30-12.45 Felicia Antohe: "Toward precision medicine on the road from cell receptors to cell proteomics"
12.45-13.00 Adriana Georgescu: "Vascular endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, new biomarkers and therapies"
13.00-13:15 Anca Gafencu: "Apolipoproteins: gene regulation and manipulation for therapeutic purposes"
13.15-13.30 Adrian Manea: "Epigenetic mechanisms in atherosclerosis: biomarkers and therapeutic targets"
13.30-13.45 Alexandrina Burlacu: "Advances in MSC-based therapies for tissue regeneration"

13:45-15:00: PAUZĂ DE PRÂNZ / SESIUNE DE POSTERE: PROIECTUL THERAVALDIS
LUNCH/POSTER SESSION: THERAVALDIS PROJECT

15.00- 19.00: Workshop THERAVALDIS: "Cardiac valves disease: new targets for therapies and tissue engineering"
CHAIRS: Werner Franke, Ileana Manduteanu, Agneta Simionescu
15:00-15:25 Ileana Mânduțeanu: Overview of the project. "Early diabetes associated alterations of aortic heart valves in a murine model of atherosclerosis"
15:25-15:50 Alexandru Fillipi: "Early diabetes induces alterations in endothelial progenitor cell phenotype and homing in a murine model of atherosclerosis"
15:50-16.15 Elena Butoi: "3D aortic valve leaflet: a model to study the effect of diabetes in valve calcification"

16.15-16.40 Manuela Călin: "The innovative nanotherapeutics designed for targeted delivery of shRNA to diseased aortic valve"
16.40-17.05 Agneta Simionescu: "Tissue Engineered Mitral Valve"
17.05-17.30 Werner Franke: "The special molecular organization of major structures in valvular cells"
17.30-17.55 Radu Deac: "The pericardium - biological tissue for artificial heart valves "
17.55-18.20 Dan Simionescu: "The VALVE-REGEN project; extracellular matrix scaffolds, adult stem cells and bioreactors for cardiac valve tissue regeneration"
18.20-18.45 Ionel Droc: "Transcatether aortic valve replacement (TAVI) - our experience in Military Hospital"
18.45 -19.00 Discussion and perspectives

19:30: WELCOME DINNER

VINERI, 20 SEPTEMBRIE 2019 - Aula George Emil Palade, IBPC "N. Simionescu "
9.00-11.05 Sesiune Ştiinţifică I/ Scientific Session I: "Cells and genes"
CHAIRS: Dimitris Kardassis, Anca Sima

9.00 - 9.25 Jean Askenasy: "Endothelial Cell Function In The Blood-Brain-Barrier"
9.25 - 9.50 Anca Dobrian: "Endothelial cell plasticity in adipose tissue"
9.50 -10.15 Angelo Azzi: "Aging and Dietary Biofactors"
10.15 -10.40 Dimitris Kardassis: "Identification of new genes and miRNAs that are implicated in the pathogenesis of the Metabolic Syndrome in mice: a transcriptomics approach"
10.40 -11.05 Mircea Ivan: "Cellular Oxygen Sensing: From HIF- Prolyl Hydroxylases to Noncoding RNAs"

11:05 -11:30 PAUZĂ DE CAFEA

11.30 -14.00 Sesiune Ştiinţifică II/ Scientific Session II: "Cell Function and Dysfunction"
CHAIRS: Angelo Azzi, Florin Lupu

11.30 -11.55 Sam Silverstein: "A critical concentration of effector leukocytes is required to eradicate bacteria and cancer cells"
11.55 -12.20 Florin Lupu: "Targeting host responses as sepsis therapy"
12.20 -12.45 Cristina Lupu: "Role of Androgen-Dependent Tissue Factor Pathway Inhibitor Regulating Protein (ADTRP) in Vascular Development and Function"
12.45 -13.10 Alexandru Schiopu: "Inflammation and repair in myocardial infarction"
13.10 -13.35 Zorina Galis: "The Human BioMolecular Atlas Program" (HuBMAP): Mapping the human body, one cell at a time"
13.35 -14.00 Şerban Moroşan: "Transparency and Communication on animal used for scientific research: Challenges and Opportunities"

14.00 -15.30 PAUZĂ DE PRÂNZ /Sesiune de postere
LUNCH/Poster Session

15.30 -19.00 Workshop DIABETER: "Searching for a novel therapy for type 1 diabetes"
CHAIRS: Maya Simionescu, Nadir Askenazy

15.30 -16.30 Session I: Therapeutic approaches to diabetes

15.30 -16.00 Irit Meivar Levy: "Liver to pancreas transdifferentiation; potential cell replacement therapy for Diabetes"

16.00 -16.15 Andrei Văcaru: "Reinstating self-tolerance in prediabetic mice by bone marrow transplantation"
16.15 -16.30 Alexandrina Burlacu: DIABETER Project presentation "Mesenchymal stromal cells as vectors with therapeutic potential to abrogate diabetic autoimmunity"

16.30 -17.00 PAUZĂ DE CAFEA/ COFFEE BREAK

17.00 -18.10 Session II: Molecular design of death-inducing mesenchymal stromal cells

17.00 -17.10 Ana Văcaru: "Mesenchymal stromal cells as vectors for expression of death molecules"
17.10 -17.25 Mihai Bogdan Preda: "Remote activity of mesenchymal stromal cells in chemical diabetes
17.25 -17.40 Anca Gafencu: "Three killer molecules: engineering adenoviruses for expression of FasL, TNFα and TRAIL"
17.40 -17.50 Mădălina Dumitrescu: "Granting killer properties to mesenchymal stromal cells by FasL-adenoviral transduction"
17.50 -18.00 Violeta Trusca: "The killing capacity of mesenchymal stromal cells -overexpressing TNFα"
18.00 -18.10 Marton Fogarasi: "Design and engineering of TRAIL-expressing mesenchymal stromal cells"

18.10 -19.00 Session III: Lessons from in vivo studies of killer MSC

18.10 -18.25 Mădălina Fenyo: "Immunomodulation of diabetic mice with killer cells"
18.25 -18.35 Ana-Maria Catrina: "Diabetic status determined by islet inflammation and insulin production in immunomodulated diabetic mice"
18.35 -19.00 Discussion

19:30: GALA DINNER

POSTERS: THERAVALDIS PROJECT (19.09.2019)

1) 3D bioprinting model of the aortic valve leaflets
Butoi E., Ciortan L., Iordache F., Macarie R.D., Tucureanu M.M., Alexandru D. Maniu H., Simionescu A., Manduteanu I.

2) Development of a bioprinted 3D model of aortic valve leaflet seeded with human valvular interstitial and endothelial cells
Butoi E., Cecoltan S., Ciortan L., Macarie R.D., Iordache F., Tucureanu M.M., Vadana M., Maniu H., Alexandru D., Simionescu A., Manduteanu I.

3) Constructing of 3D gelatin scaffolds for aortic valve tissue engineering
Butoi E., Cecoltan S., Ciortan L., Macarie R.D., Iordache F., Tucureanu M.M., Vadana M., Maniu H., Alexandru D., Simionescu A., Simionescu M., Manduteanu I.

4) Natural 3D models for tissue engineering of aortic valve
Tucureanu M., Ciortan L., Macarie R., Vadana M., Cecoltan S., Butoi E., Simionescu A., Manduteanu I.

5) Studies on transfection efficiency and toxicity of different nanocarriers of shrna-expressing plasmid on human valvular interstitial cells
Rebleanu D., Constantinescu C.A., Voicu G, Simionescu A., Manduteanu I., Calin M.

6) Establishing Correlations Between Structural and Functional Cardiac Changes and Plasma and Hemodynamic Parameters in Atherosclerosis -Associated Diabetes Mellitus
Alexandru N., Filippi A., Constantinescu C., Frunza S., Tucureanu M., Rebleanu D., Ciortan L., Fenyo M., Simionescu A., Manduteanu I., Georgescu A.

7) High glucose increase pro-osteogenic molecules expression in valvular cells in a 3D model of human aortic valve
Mihaela V., Ciortan L., Macarie R., Tucureanu M., Cecoltan S., Mihaila A.C., Simionescu A., Butoi E., Mânduteanu I.

8) Extracellular matrix remodeling induced by diabetic stimuli in a 3D model of human aortic valve leaflet
Macarie R.D., Cecoltan S., Ciortan L., Simionescu A., Butoi E., Manduteanu I.

9) Number and function of circulating endothelial progenitor cells decline in apolipoprotein E-deficient mice with diabetes and high-fat diet
Filippi A., Alexandru N., Voicu G., Constantinescu C.A., Rebleanu D., Constantin A., Fenyo M., Simionescu D.,Simionescu A., Manduteanu I., Georgescu A.

10) High glucose concentrations and TGF-β1 induce endothelial to mesenchymal transition in valvular endothelial cells
Rebleanu D., Voicu G., Constantinescu C., Ciortan L., Simionescu A., Manduteanu I., Calin M1

11) High glucose concentrations potentiate the induction of osteoblast phenotype of valvular interstitial cells exposed to osteogenic factors
Voicu G., Constantinescu C., Rebleanu D., Simionescu A., Simionescu M., Manduteanu I., Calin M.

12) VCAM-1 targeted nanoparticles are specifically internalized by high glucose-activated valvular endothelial cells cultured in a dynamic 3D bioreactor
Constantinescu C.A., Rebleanu D., Voicu G., Ciortan L., Cecoltan S., Simionescu D., Simionescu A., Manduteanu I., Calin M.

13) Study to establish an optimal model for investigation of diabetes-induced aortic valve disease
Constantinescu C.A., Ciortan L., Rebleanu D., Tucureanu M., Alexandru N., Calin M., Simionescu A., Georgescu A., Manduteanu I.

14) SMAD3 silencing inhibits endmt transition in valvular endothelial cells exposed to high glucose and osteogenic factors

Rebleanu D., Voicu G., Constantinescu C.A., Ciortan L., Macarie R.D., Vadanei M., Simionescu A., Manduteanu I., Calin M.

15) Polyplexes carrying a shRNA plasmid down-regulate the transcription factor runx2 in valvular interstitial cells exposed to high glucose concentrations and osteogenic factors

Voicu G., Constantinescu C.A., Rebleanu D., Simionescu A., Simionescu M., Manduteanu I., Calin M.

POSTERS (20.09.2019)

1) Mesenchymal stromal cells-derived factors improve the colonization of collagen 3D scaffolds with skin cells

Rosca A.M., Tutuianu R., Pruna V., Albu Kaya M.G., Neagu T.P., Lascar I., Simionescu M., Titorencu I.

2) Mesenchymal stromal cells derived exosomes sustain the re-epithelialization process on skin organotypic models

Tutuianu R., Rosca A.M., Pruna V., Lascar I., Neagu P., Simionescu M., Titorencu I.

3) Isolation and characterization of human hypertrophic derived myofibroblasts

Florea G., Iacomi D. M., Radulescu L., Tutuianu R., Pruna V., Rosca A.M., Lascar I., Simionescu M., Titorencu I.

4) Effects of low-dose proton radiation on oxidative stress produced in endothelial and epithelial cells

Mihaila A., Vadana M., Bacalum M., Raileanu M., Ciortan L., Caciun L., Esanu T.R., Manduteanu I., Simionescu M., Butoi E.

5) Generation and characterization of distinct mouse neutrophil subpopulations

Ciortan L., Macarie R., Cecoltan S., Mihaila A., Vadana M., Tucureanu M., Manduteanu I., Simionescu M., Butoi E.

6) Optimization of transfection using fullerene-based nanoparticles for gene therapy purposes

Trusca V.G., Fenyo I.M., Dumitrescu M., Pinteala M., Gafencu A.V.

7) Interleukin-10 signal sequence cloned in front of the luciferase drives the reporter protein secretion

Moise L.G., Tudor L.E., Trusca V.G., Gafencu A.V.

8) The secretory potential of interleukin-10 by the encapsulated endothelial cells

Tudor L.E., Moise L.G., Trusca V.G., Fundueanu G., Bucatariu S., Simionescu M., Gafencu A.V.

9) VCAM-1 targeted flavanone-loaded lipid nanoemulsions exert anti-inflammatory effects on activated endothelial cells

Fuior E.V., Voicu G., Deleanu M., Rebleanu D., Constantinescu C.A., Safciuc F., Simionescu M., Călin M.

10) A new family of vanadium compounds stimulates insulin receptor phosphorylation in HepG2 cells in a time and dose-dependent manner

Cărnuță M.G., Pătrașcu A.A., Maxim C., Anghelache M.F., Mânduțeanu I., Popescu D.L, Călin M.

11) Downregulation of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in the aorta of APOE-deficient mice using P-selectin targeted RAGE-shRNA lipoplexes

Constantinescu C.A., Fuior E.V., Rebleanu D., Voicu G., Deleanu M., Tucureanu M, Butoi E., Mânduțeanu I., Escriou V., Simionescu M., Călin M.

12) Development and characterization of an in vitro experimental model of hypertrophic cardiomyocytes of pathological type

Comarita I.K., Constantin A., Alexandru N., Filippi A., Nemecz M., Vilcu A., Procopciuc A., Tanko G., Simionescu M., Georgescu A.

13) Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from subcutaneous adipose

tissue and bone marrow from the hamster
Procopciuc A., Comarita I.K., Vilcu A., Filippi A., Alexandru N., Nemecz M., Tanko G., Constantin A., Georgescu A.

14) Study of vascular dysfunction and cardiac hypertrophy in an experimental animal model of atherosclerosis
Vilcu A., Comarita I.K., Procopciuc A., Safciuc F., Alexandru N., Filippi A., Constantin A., Nemcz M., Tanko G., Simionescu M., Georgescu A.

15) Epigenetic regulation of NADPH oxidase 5 expression by histone acetyltransferase-activated mechanisms in human macrophages exposed to inflammatory conditions; potential role in atherosclerosis
Vlad M.L., Manea S.A., Raicu M., Muresian H., Simionescu M., Manea A.

16) Activation of p300 histone acetyltransferase-dependent signaling pathways induces NADPH oxidase expression and oxidative stress in the kidney of diabetic mice
Lazar A.G., Cosac M.T. , Vlad M.L., Raicu M., Manea A., Manea S.A.

17) Murine macrophages proteomic alterations induced by neutrophil secretome using dynamic pulsed SILAC methodology
Suica V.I., Ivan L., Uyy E., Cerveanu-Hogas A., Boteanu R., Butoi E., Manea A., Antohe F., Simionescu M.

18) Alarmins expression in atherosclerotic lesions under severe anti-hyperlipidemic treatment; a mass spectrometry based proteomic approach
Uyy E., Ivan L., Suica V.I., Boteanu R., Hansen R., Antohe F.

19) Proteomic profiling of junctional proteins in HMGB1-stimulated human coronary artery endothelial cells
Boteanu R, Antohe F., Simionescu M.

20) Probiotics administration to hyperlipidemic hamsters modulates microRNAs levels in liver and serum
Niculescu L.S., Dulceanu M.D, Stancu C.S., Carnuta M.G., Barbalata T., Sima A.V.

21) Hyperlipidemia alters the quality of HDL and impedes cholesterol efflux in the small intestine; the effect of ginger extract
Barbalata T., Deleanu M., Carnuta M.G., Niculescu L.S., Sima A.V., Stancu C.S.

22) Human macrophages exposed to aggregated LDL become foam cells, without developing endoplasmic reticulum, oxidative or inflammatory stress
Sanda G.M., Toma L., Stancu C.S., Deleanu M., Moraru O.E., Sima A.V.

23) Influence of aging on the quality and dynamics of mouse cardiac fibroblasts
Rusu E.G., Lupan A. M., Marinescu C., Preda M.B., Burlacu A.

24) MicroRNAs characteristic to fibrosis and hypertrophy are up-regulated during natural cardiac aging
Lupan A. M., Rusu E.G., Marinescu C., Preda M.B., Burlacu A.

25) Hypoxia regulates the pro-angiogenic effect of subcutaneously transplanted mesenchymal stromal cells
Preda M.B., Popescu S., Tutuianu R., Rosca A.M., Simionescu M., Burlacu A.

COMITETUL DE ORGANIZARE / ORGANIZING COMMITTEE

COMITETUL ŞTIINŢIFIC DE PROGRAM / SCIENTIFIC PROGRAM COMMITTEE

Maya Simionescu
Ileana Mânduţeanu
Nadir Askenasy
Manuela Călin

COMITETUL DE ORGANIZARE/ ORGANIZING COMMITTEE

Adriana Georgescu
Manuela Călin
Mirel Popa
Loredan Niculescu
Viorel Şuică

SUPORT LOGISTIC / LOGISTICS SUPPORT

Răzvan Macarie
Adrian Manea
Irina Titorencu
Ana Maria Roşca
Dorin Alexandru
Iulia Bratu
Florenţa Gănguţă
Elena Cornea
Constantin Comârlau

Institutul de Biologie şi Patologie Celulara "N. Simionescu"
Str. B.P. Haşdeu nr. 8, Bucureşti, Telefon: +4021.319.45.18; Fax: +4021.319.45.19

ICBP
40
YEARS

Finanțat de Uniunea Europeană NextGenerationEU

Planul Național de Redresare și Reziliență

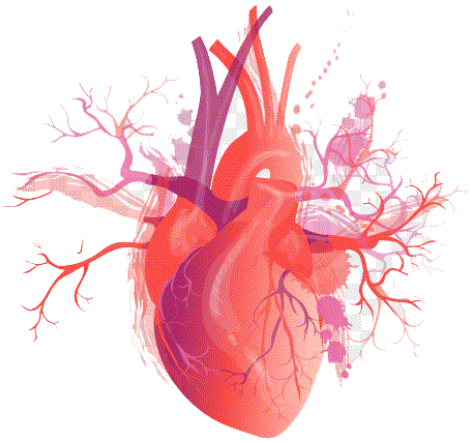
C9. „I8. **Development of a program to attract highly specialized human resources from abroad in research, development, and innovation activities”**

Kick-off meeting of the IMMUNOCARD project

Development of a novel immunomodulatory therapy against cardiac inflammation in myocardial infarction, myocarditis and sepsis

Contract number: 760061/23.05.2023, code 148/15.11.2022

Project director: Alexandru Şchiopu, MD, PhD



Bucharest, September 21st, 2023, 14.00

Program

14:00
Session 1

- **Opening remarks: Acad. Maya Simionescu**
- **Project presentation: Alexandru Şchiopu, MD, PhD**

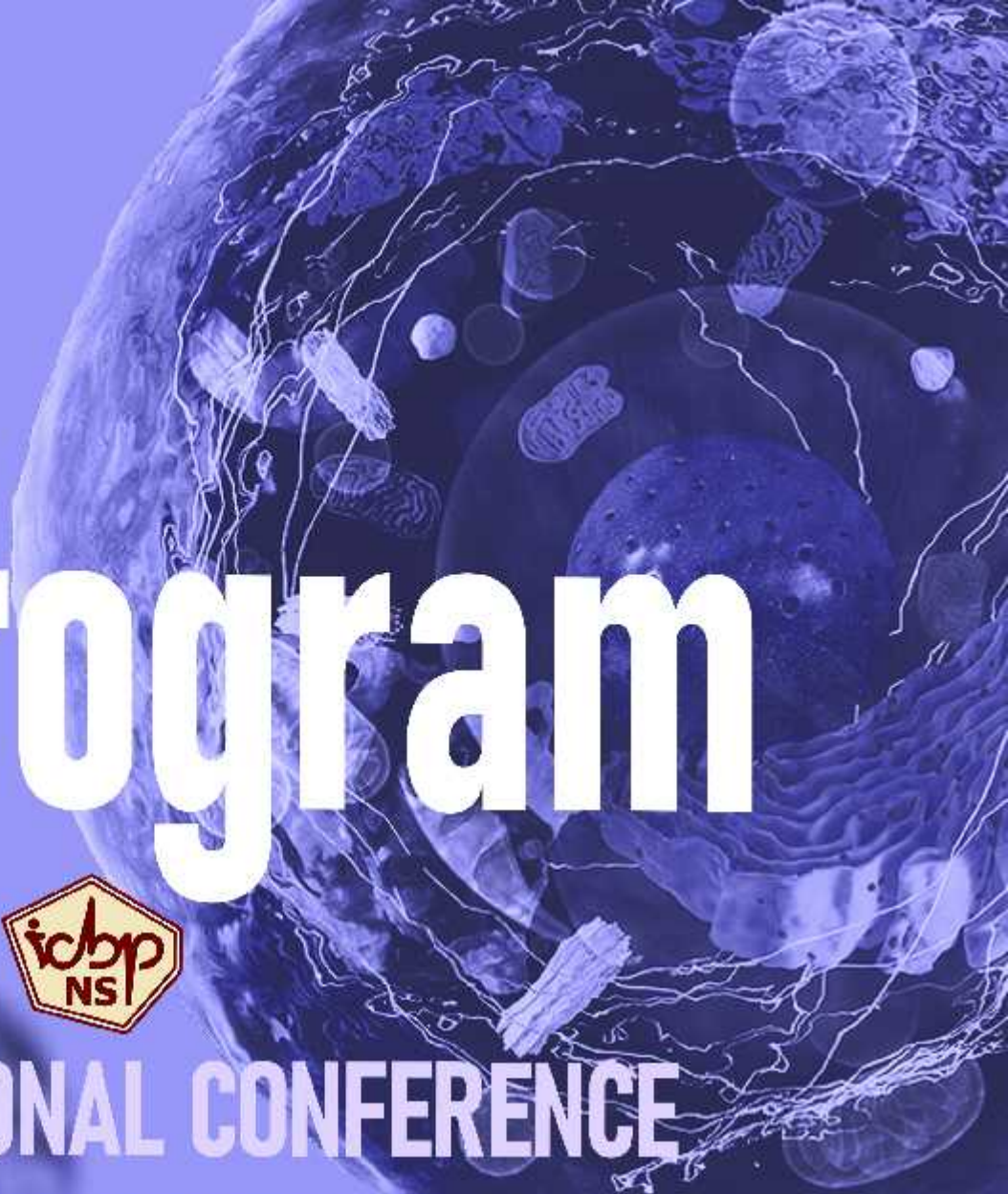
15:00
Group photo

15:30
Session 2

- **Workshop of the research team implicated in the project implementation**

20-21
November
2025

Program



INTERNATIONAL CONFERENCE

The 42nd ANNUAL SCIENTIFIC SESSION OF THE ROMANIAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

under the aegis of the Romanian Academy
dedicated to the Researcher and Designer's Day

A hybrid event – online and onsite - 8, B. P. Hasdeu Street, Bucharest
organized by Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"
Bucharest Branch of Romanian Society for Cell Biology and
Section of Biological Sciences of the Romanian Academy

PROGRAM

INTERNATIONAL CONFERENCE

42nd ANNUAL SCIENTIFIC SESSION

OF THE ROMANIAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

A hybrid event organized **online** and **onsite**

under the aegis of the Romanian Academy

by

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"

Bucharest branch of Romanian Society for Cell Biology (RSCB)

and

Section of Biological Sciences of the Romanian Academy

Dedicated to the Researcher's and Designer's Day

20-21 November 2025

Locations: online (Zoom) and onsite at ICBP "Nicolae Simionescu"

8, Bogdan Petriceicu Hașdeu Street, Bucharest 050568, Romania

Organizing and Scientific Committee

- **Acad. Maya SIMIONESCU**, President of RSCB
- **Dr. Anca V. GAFENCU**, President of Bucharest RSCB Branch
- **Dr. Loredan S. NICULESCU**, General Secretary of RSCB
- **Prof. Cătălina G. PISOSCHI**, President of RSCB Craiova Branch
- **Prof. Tudor C. BADEA**, President of RSCB Brașov Branch
- **Assoc. Prof. Vlad-Alexandru TOMA**, President of RSCB Cluj Branch
- **Prof. Anca HERMENEAN**, President of RSCB Arad Branch

Motto: Together we can find ideas... and good ideas change the world

Dear Colleagues,

We are delighted to invite you to attend the upcoming International Conference, **the 42nd Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology** (RSCB) held under the auspices of the Romanian Academy.

The Conference is dedicated to "the Researchers and Designer's Day".

The event will take place on 20 - 21 November 2025 as a hybrid gathering, both onsite and online, and will be hosted in the Aula George Palade of ICBP-NS.

The conference is intended to be a celebration of our everlasting desire to understand the wonders of the nature, outside and within us, and to share ideas, experiences, get inspiration and build bridges between fields and generations of researchers.

The program includes 10 scientific sessions comprising

- Keynote lectures
- Round Table on *Pathophysiology and Molecular Interactions*
- Round Table on *Modulation of chronic inflammatory response polarization and amplitude by a vertebrate-specific gene: RGC-32*
- Round Table on *Omics Approaches in Molecular Pathology*
- Young Scientists presentations
- Short Communications (ePosters)
- General Assembly of RSCB members

As shown below, the program covers a large diversity of scientific topics, an expression of the development of cellular and molecular biology nowadays.

This year, there will be presented 25 papers and 15 ePosters by 53 participants.

We are lucky to have in our Society excellent senior scientists and numerous young and talented investigators.

We look forward to your valuable participation and appreciate your time and consideration.

Maya Simionescu

and the Organizing Committee

PROGRAM

Day One – Thursday, 20 November 2025

9:30 - 10:15 Opening session

- **Acad. Maya SIMIONESCU**, President, RSCB
- **Acad. Marius ANDRUH**, Vice-president of the Romanian Academy
- **Book launch event:** *NICOLAE SIMIONESCU – ARHITECTUL ȘCOLII ROMÂNEȘTI DE BIOLOGIE CELULARĂ*, Ion Longin Popescu

10:15 - 10:45 Scientific Session 1

Chair: **Acad. Maya SIMIONESCU**

Keynote lecture

- **Prof. Kyriakos KYPREOS**, ICBP-NS, Bucharest and University of Patras, Greece - *Unmet Cardiovascular Risk beyond LDL-C: Insights into Contributing Factors*

10:45 - 11:00 Coffee break

11:00 - 12:00 Scientific Session 2

Chairs: **Prof. Carmen E. COTRUTZ** and **Assoc. Prof. Vlad-Alexandru TOMA**

Round Table - *Pathophysiology and Molecular Interactions*

- **Darius D. RUS,** Babes-Bolyai University, Cluj-Napoca - *Non-Enzymatic Sugar Association Leads to Structural and Functional Modification in Haemoproteins*
- **Marta ANATOLIE**, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Science, Libechov, Czech Republic - *From Endomitosis to Aberrant Chromosome Pairing: Cellular Mechanisms Driving Clonal Reproduction and Male Sterility in Fish Hybrid Complexes*
- **Doinița TEMELIE-OLINICI**, "Grigore T. Popa" University of Medicine and Pharmacy Iași - *The Role of IL-6 in Activating the "Molecular Scar" of Psoriasis*
- **Kriti PATHAK**, Promega GmbH - *NanoLuc® Luciferase: A New Era of Gene and Protein Reporter Technologies*

12:00 - 13:00 Lunch break

13:00 - 14:30 Scientific Session 3

Chairs: **Acad. Anca V. SIMA** and **Dr. Camelia S. STANCU**

Young Scientists Communications

- **Teodora BARBĂLATĂ**, Postdoc, ICBP-NS, Bucharest - *Overexpression of Endogenous Apolipoprotein A-I and Paraoxonase 1 Genes in the Liver of apoE$^{-/-}$ Mice by CRISPR/dCas9: an Approach to Impede Atherosclerosis Progression*
- **Marius MULȚESCU**, Ph.D. student, ICBP-NS, Bucharest - *Human Apolipoprotein A-II Modulates the Mitochondrial Respiration in Endothelial Cells*
- **Mihaela G. TURTOI**, Postdoc, ICBP-NS - *Nanodelivery of Bioactive Natural Products to Inhibit Endothelial-to-Mesenchymal Transition: A Novel Therapeutic Strategy for Atherosclerosis*
- **Ruxandra ANTON**, Ph.D. student, ICBP-NS, Bucharest - *Targeted Nanoparticles for Hsp90 Inhibitors Delivery to Fibrotic Cardiac Tissue*
- **Diana V. UȚĂ**, Ph.D. student, ICBP-NS, Bucharest - *Preliminary Data Evaluating the TLR4 Inhibition as a Strategy to Mitigate Diabetic Foot Syndrome*
- **Paul-Ștefan PANAITESCU**, Ph.D. student, "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca - *Effect of Gut Microbiota-Derived Metabolite TMAO on Neurodegeneration, Inflammation, Oxidative Stress and Motor Function in Animal Models of Parkinson's Disease*
- **Răzvan-Geo ANTEMIE**, Ph.D. student, "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca - *In Vitro Evaluation of the Antioxidant Activity of Polyphenol Quinazolin-4(3h)-One and Catechol Hydrazinyl-Thiazole Derivatives on a Selection of Cell Lines*
- **Ioana REDNIC**, Ph.D. student, University of Medicine and Pharmacy of Craiova - *Antioxidant and Neuroprotective Perspectives of Some Edible Fruit's Extracts Based on a Comparative Phytochemical Profiling and Bioactivity*
- **Bianca SOCEANU**, Ph.D. student, "Grigore T. Popa" University of Medicine and Pharmacy Iași - *The Role of Bioactive Molecular Components of Human Milk in Regulating Cellular Processes*

14:30 - 14:45 Coffee break

14:45 - 15:30 Scientific Session 4

Chairs: **Prof. Anca HERMENEAN** and **Dr. Anca V. GAFENCU**

Short Communications Session (e-Posters) - Part 1

- **Laura M. DĂIAN** et al., ICBP-NS, Bucharest - *Preliminary Dynamics of β-Cell Adjustment to Reduced Mass and Diet-Related Stress*
- **Elena M. LAMBĂ** et al., ICBP-NS, Bucharest - *Sweet Habits: Shaping Pancreatic β-cell Adaptation*
- **Mădălina DUMITRESCU** et al., ICBP-NS, Bucharest - *Expression of Apolipoprotein E4 by Adenovirus-Mediated Gene Transfer to ApoE Deficient Mice Modulates the Properties of HDL in a Dose Dependent Way*
- **Ioana M. FENYO** et al., ICBP-NS, Bucharest - *Apolipoprotein A1 is involved in glucose homeostasis*
- **Nino MARQUÉ** et al., Institut Agro Rennes-Angers, Rennes, France - *Peroxidase Activity of Hemoglobin Subjected to Glycative Stress by Measuring Peroxidase Activity and Molecular Changes in Hemoproteins in a High-Sugar Concentration Microenvironment*
- **Claudia-Andreea MOLDOVEANU** et al., Babes-Bolyai University, Cluj-Napoca - *Matrix Metalloproteinases as Early Biomarkers in Parkinson's Disease*
- **Mihaela BALAȘ** et al., Faculty of Biology, University of Bucharest - *Exploring the Biological Effects of $EuTiO_2$ Nanoscintillator-Mediated Radio-Photodynamic Therapy in Breast Cancer Cells*

15:30 - 15:45 Coffee break

15:45 - 17:00 Scientific Session 5

Chairs: **Prof. Tudor BADEA** and **Acad. Ileana MÂNDUȚEANU**

Round Table - *Modulation of chronic inflammatory response polarization and amplitude by a vertebrate-specific gene: RGC-32*

- **Tudor BADEA**, Transylvania University Brașov - *Response Gene to Complement 32 - a Modulator of Inflammatory Responses in Mice and Humans*
- **Sonia VLAICU**, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, USA - *The Role of Response Gene to Complement-32 in Atherogenesis*
- **Alexandru TATOMIR**, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, USA - *RGC-32 as a new factor regulating reactive astrocytosis in neuroinflammation*
- **Horea RUS**, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, USA - *RGC-32 is a Biomarker of Disease Activity and Treatment Response in Multiple Sclerosis*

Day Two – Friday, 21 November 2025

9:30 - 10:00 Scientific Session 6

Chair: **Dr. Felicia ANTOHE**

- **Rostyslav BILYY,** ICBP-NS, Bucharest - *Seeing the Invisible: Imaging Neutrophil-Derived ROS in Tumor and Inflammatory Tissues?*

10:00 - 10:20 Scientific Session 7

Chairs: **Dr. Irina TITORENCU** and **Dr. Elena BUTOI**

Short Communications Session (e-Posters) - Part 2

- **Raluca ȚUȚUIANU** et al., ICBP-NS, Bucharest - *Characterization and Biological Assessment of Sturgeon-Derived Collagen Porous Scaffolds for Soft Tissue Engineering*
- **Sergiu-Marian VATAMANU** et al., ICBP-NS, Bucharest - *Establishment and Characterization of Human Gingival Fibroblast Cultures*
- **Ana-Maria ROŞCA** et al., ICBP-NS, Bucharest - *Composites Based on Collagen, Chondroitin Sulfate, and Sage Oil with Potential Use in Dentistry*
- **Daniela-Mădălina GHEȚU** et al., ICBP-NS, Bucharest - *Phenoxazine Counteracts High-Glucose-Induced Alterations of Human Mitochondrial Genes: Results on Cardiac Organoids*

10:20 - 10:30 Coffee break

10:30 - 11:45 Scientific Session 8

Chairs: **Prof. Ioana STREAȚĂ** and **Prof. Cătălina G. PISOSCHI**

Round Table - *Omics Approaches in Molecular Pathology*

- **Ioana STREAȚĂ**, University of Medicine and Pharmacy of Craiova - *Multiomics Assessment in Rare Diseases*
- **Anca-Lelia RIZA** and **Mihai G. NETEA**, University of Medicine and Pharmacy of Craiova - *Functional Genomics in Sepsis*
- **Daniel PIRICI**, University of Medicine and Pharmacy of Craiova - *Water channel aquaporin 4 modulates amyloid deposits and cognitive performance in a transgenic animal model for Alzheimer's disease*
- **Adrian FRANTEA**, University of Medicine and Pharmacy of Craiova - *Dual Transcriptome – Proteome Analysis Reveals Distinct Immune Endotypes in Sepsis*

- **Răzvan PLEȘEA**, University of Medicine and Pharmacy of Craiova - *Genotype and Phenotype Correlations in Breast Cancer - Single Center Experience*

11:45 - 12:00 Coffee break

12:00 - 12:30 Scientific Session 9

Chair: **Acad. Maya SIMIONESCU**

Keynote lecture

- **Prof. Anca D. DOBRIAN**, Department of Biomedical and Translational Sciences, Eastern Virginia Medical School at Old Dominion University, Norfolk, VA USA- *Extracellular Vesicles: from cellular sentinels to mediators of the biology of adversity*

12:30 - 12:50 Scientific Session 10

Chair: **Dr. Manuela CĂLIN**

Short Communications Session (e-Posters) - Part 3

- **Carmen NECULACHI** et al, ICBP-NS, Bucharest - *MiR-210 Deficiency Enhances Pro-Inflammatory Activation and Disrupts M2 Macrophage Differentiation in Murine Models*
- **Cătălina MARINESCU-COLAN** et al., ICBP-NS, Bucharest - *From Cancer to Infarcted Hearts: GLIPR1 as a Detrimental Regulator in Activated Cells*
- **Gabriela TANKO** et al., ICBP-NS, Bucharest - *An R Shiny-Based Platform for Automated Quantitative Analysis of Insulin Granule on Electron Micrographs*
- **Alexandra VÎLCU** et al., ICBP-NS, Bucharest - *Exploring the Role of Mitochondrial Dysfunction in Cardiac Hypertrophy in an Experimental Model of Atherosclerotic Cardiovascular Disease; Evaluation of the Therapeutic Potential of MTP-131*

12:50 - 13:00 Coffee break

13:00 - 13:30 General Assembly of RSCB members

- 2025 Reports of RSCB Branches
- 2025 Financial Report for RSCB
- Proposals for 2026 Scientific Meeting of RSCB
- Varia Topics
- Final Conclusions and Remarks: Presidents of RSCB Branches

INSTITUTE OF CELLULAR BIOLOGY AND PATHOLOGY
"NICOLAE SIMIONESCU"
8, Bogdan Petriceicu Hașdeu Street, Bucharest 050568, Romania
www.icbp.ro

Institutul de Biologie si Patologie Celulara
"Nicolae Simionescu"

"Petru Poni"
Institute of Macromolecular
Chemistry

ȘCOALA DE VARĂ:

"Nanoparticule inteligente pentru livrarea directionată de compuși bioactivi: preparare, caracterizare si aplicații"

va fi organizata in cadrul proiectului

PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697 (INTERA): "**Terapii inteligente pentru boli non-comunicabile, bazate pe eliberarea controlată de compuși farmacologici din celule încapsulate după manipulare genetică sau bionanoparticule vectorizate** (13PCCDI/2018),

sub-proiect INTERA 3: "**Nanobioparticule inteligente concepute pentru vectorizarea compușilor bioactivi în terapia inflamației vasculare**"

in perioada **23-24 mai 2019**, in **Bucuresti**.

Tematica: Progresele înregistrate în domeniul nanotehnologiilor și aplicarea acestora în medicină a dus la apariția nanomedicinei. Formularea agenților terapeutici în nanoparticule determină cresterea eficacității acestora prin livrarea specifică la țesuturile afectate și reducerea efectelor secundare.

Școala de vară va oferi o imagine de ansamblu în folosirea nanoparticulelor inteligente pentru livrarea de compusi bioactivi, acoperind fundamentele formării și stabilității nanoparticulelor organice și anorganice, împreună cu metode de caracterizare a acestora si folosirea lor pentru transportul directionat.

Pe langă cursurile teoretice care vor furniza informații despre diferite tipuri de nanoparticule inteligente, inovatoare pentru livrarea de medicamente, tehnologiile de încapsulare și tehnicile de caracterizare a nanoparticulelor, vor fi o serie de demonstrații practice în laboratoarele Facultatii de Chimie Aplicată și Știința Materialelor, Departamentul Știința și Ingineria Materialelor Oxidice și Nanomateriale, Universitatea POLITEHNICA din București si ale Institutului de Biologie si Patologie Celulara "N.Simionescu" din Bucuresti.

Comitet stiintific de organizare:

Dr. Manuela Calin, IBPC "NS", Bucuresti

Dr. Anca Gafencu, IBPC "NS", Bucuresti

Prof. Anton Ficai, UPB, Bucuresti

Dr. Gheorghe Fundueanu, ICMPP, Iasi

Institutul de Biologie si Patologie Celulara

"Nicolae Simionescu"

"Petru Poni"
Institute of Macromolecular
Chemistry

ȘCOALA DE VARĂ:

"Nanoparticule inteligente pentru livrarea directionată de compuși bioactivi: preparare, caracterizare si aplicații"

Program:

23 Mai 2019

LOCATIA: Universitatea POLITEHNICA din București, Facultatea de Chimie Aplicată și Știința Materialelor, Departamentul Știința și Ingineria Materialelor Oxidice și Nanomateriale, **Cladire CAMPUS**, Bulevardul Iuliu Maniu nr. 6.

9:00-12:00 Prezentari teoretice: cladire CAMPUS

9:00-10:00 Obtinerea si caracterizarea nanoparticulelor magnetice; nanoformulari cu polifenoli (Prof. Dr. Ing. Anton Ficai, Conf Dr. Ing. Denisa Ficai)

10:00-11:00 Folosirea nanoparticulelor magnetice ca vectori pentru transportul de compusi bioactivi (Dr. Adrian Fifere, ICMPP)

11:00-11:30: Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor magnetice acoperite cu polizaharide **(**Drd. Chim. Cornelia Ioana Ilie, UPB),

11:30-12:00: Nanoparticule de oxid de fier acoperite cu dextran biosintetizat ca platforma pentru transportul polifenolilor (Dr. Anca Petrovici, ICMPP)

12:00-13:00 Masa de pranz – la cantina UPB

13:00-17:00 Demonstrații practice in laboratoare UPB, cladire CAMPUS

● Sinteza nanoparticulelor magnetice utilizand metoda coprecipitarii din solutie (Drd. Chim. Cornelia Ioana Ilie, Dr. Ing. Angela Spoiala),

● Incarcarea nanoparticulelor magnetice cu polifenoli (Drd. Chim. Cornelia Ioana Ilie, Dr. Ing. Angela Spoiala),

● Caracterizarea nanoparticulelor magnetice utilizand metode fizico chimice specific (Drd. Chim. Cornelia Ioana Ilie, Dr. Ing. Angela Spoiala)

24 Mai 2019

LOCATIA: Institutul de Biologie si Patologie Celulara “N.Simionescu”, Str. B.P.Hasdeu nr 8

9:00-12:00 Prezentari teoretice - amfiteatrul G.E. Palade

9:00-10:00 Folosirea nanoparticulelor lipidice pentru transportul directionat de agenti terapeutici la peretele vascular (Dr. Manuela Calin)

10:00-10:30 Tehnici de obtinere si caracterizare a nanoparticulelor lipidice directionate specific (Dr. Daniela Rebleanu)

10:30-11:00 Reducerea activarii endoteliului cu ajutorul nanoemulsiilor lipidice incarcate cu polifenoli (Drd. Elena-Valeria Fuior)

11:00-11:30 Principii de baza in citometria in flux (Dr. Alexandru Filippi)

11:30-12:00 Principii de baza in microscopia de fluorescenta si confocala pentru studiul celulelor stem mezenchimale in vitro si in vivo (Dr. Bogdan Preda)

12:00-13:00 Masa de pranz

13:00-17:00 Demonstrații practice in laboratoare IBPC-NS.

Demonstratiile practice se vor realiza pe 3 grupe, prin rotatie.

- **Grupa 1.** Lab. BioNanoMed: Metode de obtinere si caracterizare a nanoparticulelor lipidice (Drd. EV Fuior, Dr. D. Rebleanu, Drd. CA Constantinescu); Lab. Citometrie in flux: Determinarea eficientei de preluare a nanoparticulelor de catre celule cu ajutorul citometrului de flux (Dr. A. Filippi)
- **Grupa 2.** Lab. Biologia Celulelor Stem: Vizualizarea preluarii nanoparticulelor de catre celulele stem mezenchimale (Dr. B. Preda)
- **Grupa 3.** Lab. Reglare Genica si Terapii moleculare: Modele experimentale: culturi celulare, marcare, inducerea expresiei de proteine reporter sau cu potential terapeutic. Formarea complexelor nanoparticule- ADN si testarea complexarii pe gel de agaroza. (Dr. A. Gafencu, Dr. V. Trusca)

PROIECT PN II PARTENERIATE Adriana Georgescu

Monday, 06 December 2010 22:42 Laboratories - Vascular Dysfunction in Diabetes and Obesity

PROIECT PN II PARTENERIATE

PN2 42138 / 1.10.2009, Dr. Adriana Georgescu

Titlul proiectului:

Raportul dintre microparticulele circulante si celulele endoteliale progenitoare, un nou marker celular al disfunctiilor endoteliale induse de asocierea dintre hipertensiune si hipercolesterolemie; efectul anti-aterosclerotic al irbersartanului

Director proiect: Dr. Adriana Georgescu, cercetator stiintific principal II **-** *Institutul de Biologie si Patologie Celulara „Nicolae Simionescu", Bucuresti* si Postdoctorand - *Institutul de Chimie Macromoleculara „Petru Poni", Iasi*

Proiect finantat de: Unitatea Executiva pentru Finantarea Invatamantului Superior, Cercetarii, Dezvoltarii si Inovarii (UEFISCDI)

Directia de Finantare a Dezvoltarii si Inovarii

Programul: Parteneriate in domenii prioritare

Domeniul: Sanatate

Acronim proiect: MPEPC

Perioada: 2008-2011

Rezumatul proiectului:

Ateroscleroza este o afectiune inflamatorie, in care factori de risc ca, hiperlipidemia, hipertensiunea, diabetul, pot stimula direct sau indirect endoteliul arterial provocand atat disfunctii, cat si lezari celulare. Datorita numarului in crestere al bolilor cardiovasculare, exista un interes deosebit pentru investigarea mecanismelor disfunctiilor endoteliale, cum ar fi intelegerea raportului dintre microparticulele circulante (MPs) si celulele endoteliale progenitoare (EPCs), ce ar putea conduce la noi strategii terapeutice.

Scopul: Studiul propus are ca tinta dezvoltarea unui nou model animal, hamsterul hipertensiv-hipercolesterolemic (HH) in scopul de a explora noi markeri biologici (MPs si EPCs) ai modificarilor structurale si functionale ale arteriolelor, cu potentiale aplicatii in cercetarea clinica si ingrijirea pacientilor. In acest sens, prin utilizarea modelului HH tratat cu irbersartan (HHI), ne vom concentra asupra abordarii unui nou tratament bazat pe capacitatea antagonistului receptorului AT1, irbersartan, de a reduce presiunea sangelui, nivelele de colesterol, nivelele de MPs, de a creste EPCs, dar si de a imbunatatii disfunctiile endoteliale asociate atat hipertensiunii cat si hipercolesterolemiei. Avem in vedere o abordare complexa impreuna cu o echipa de cercetatori proveniti din cercetarea fundamentala si din cea clinica, pentru a evidentia biomarkerii de relevanta in medicina si noi tinte pentru terapie.

Principalele obiective sunt:: (1) Caracterizarea modelelor animale experimentale HH si HHI comparativ cu cel al hamsterilor control (C), respectiv a pacientilor HH si HHI fata de subiectii control (C); (2) Cuantificarea nivelelor de MPs si EPCs circulante in corelatie cu concentratiile plasmatice de glucoza si colesterol, cu alterarile presiunii sangelui arterial si ale ritmului cardiac, atat la animalele investigate cat si la pacienti; (3) Caracteristicile structurale ale peretelui vascular arterial la animale si la pacienti, in corelatie cu nivelele de MPs si EPCs; rolul metaloproteazelor matriceale (MMPs) si a inhibitorilor tisulari ai metaloproteazelor (TIMP); (4) Evaluarea functiei peretelui arterial in relatie cu modificarile structurale si biochimice, la grupele experimentale de animale si pacienti; (5) Efectul MPs si EPCs asupra reactivitatii arteriolelor de rezistenta izolate de la modelele animale; **(**6) Studiul relatiei cauzale directe dintre cresterea eliberarii de MPs, scaderea nivelelor de EPCs si raspunsul inflamator al peretelui vascular arterial, prin investigarea exprimarii proteice a markerilor inflamatori specifici (P-selectina, E-selectina, vWF, TF, IL-6, MCP-1, RANTES, eNOs, VEGF, SDF-1) in hamsteri; (7) Investigarea mecanismelor moleculare prin care MPs

si EPCs influenteaza functia peretelui vascular arterial in grupele de animale studiate; rolul receptorilor AT1 pentru AngII.

Metodele includ: modele animale experimentale, date clinice ale pacientilor, testari biochimice, citometria de flux, microscopia electronica, tehnica miografului izometric, biologia moleculara.

Rezultatele estimate sunt: (1) realizarea unui model animal, care mimeaza afectiunile umane atat din punct de vedere metabolic cat si patofiziologic (cum ar fi lezarile celulare ce apar in ateroscleroza umana); (2) gasirea unor noi biomarkeri ai disfunctiilor endoteliale, ce vor oferi nu numai tinte noi in patofiziologie, ci si oportunitatea clinica de a detecta bolile intr-un stadiu timpuriu, de a cuantifica riscul acestora, si de a aplica terapia adecvata la pacienti.

Implementarea obiectivelor proiectului va creste competenta cercetarii biomedicale, vizibilitatea stiintei romanesti, transpunerea ideilor de la masa de lucru la patul bolnavului si atragerea tinerilor cercetatori catre cercetarea biomedicala. Toate activitatile sunt in concordanta cu obiectivul general al programului 4, Sanatate, tematica de cercetare 4.1.6.; 4.1.1. ; 4.1.3.

Concluzii: Rezultatele studiului vor evidentia o noua provocare in restabilirea homeostaziei peretelui arterial, prin controlul farmacologic al eliberarii MPs si EPCs.

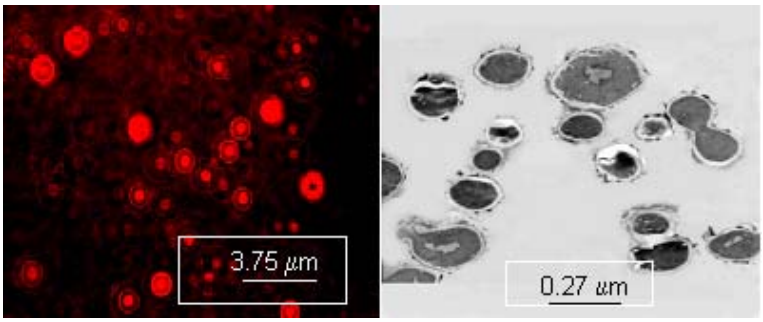
Participantii la realizarea proiectului:

1. Institutul de Biologie şi Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" - ***Coordonator***

2. Spitalul Clinic de Urgenta Bucuresti - **Partener 1**

3. Spitalul de Urgenta al M.A.I."Profesor Dr. D. Gerota" – **Partener 2**

Obiectivele generale: Studiul are ca scop: **(1)** dezvoltarea unui nou model animal, hamsterul hipertensiv-hipercolesterolemic (HH), pentru a urmari existenta unei posibile corelatii intre microparticulele circulante (MPs), celulele endoteliale progenitoare (EPCs) si contributia lor la disfunctia vasculara; **(2)** investigarea efectului tratamentului cu irbersartan asupra animalelor HH; **(3)** o abordare complexa a pacientilor HH, pentru a evidentia noi biomarkeri de relevanta in medicina si noi tinte pentru terapie.



Microparticulele circulante

Modul de organizare a proiectului (managementul proiectului): Planul de lucru

Etapa intermediara an 2009

Obiectiv.1. **Caracterizarea modelelor animale experimentale HH si HHI comparativ cu cel al hamsterilor control (C), respectiv a pacientilor HH si HHI fata de subiectii control (C);**

Etapa finala an 2009

Cuantificarea nivelelor de MPs si EPCs circulante in corelatie cu concentratiile plasmatice de glucoza si colesterol, cu alterarile presiunii sangelui arterial si ale ritmului cardiac, atat la animalele investigate cat si la pacienti;

Etapa unica an 2010

Obiectiv 3. Caracteristicile structurale ale peretelui vascular arterial la animale si pacienti, in corelatie cu nivelele de MPs si EPCs; rolul metaloproteazelor matriceale (MMPs si a inhibitorilor tisulari ai metaloproteazelor (TIMP);

Obiectiv 4. Evaluarea functiei peretelui arterial in relatie cu modificarile structurale si biochimice, la grupele experimentale de animale si pacienti;

Etapa unica an 2011

Obiectiv 5. Efectul MPs si EPCs asupra reactivitatii arteriolelor de rezistenta izolate de la modelele animale;

Obiectiv 6: Studiul relatiei cauzale directe dintre cresterea eliberarii de MPs, scaderea nivelelor de EPCs si raspunsul inflamator al peretelui vascular arterial, prin investigarea exprimarii proteice a markerilor inflamatori specifici (P-selectina, E-selectina, vWF, TF, IL-6, MCP-1, RANTES, eNOs, VEGF, SDF-1) in hamsteri;

Obiectiv 7: Investigarea mecanismelor moleculare prin care MPs si EPCs influenteaza functia peretelui vascular arterial in grupele de animale studiate; rolul receptorilor AT1 pentru AngII.

Rezultate obtinute

Rezultate semnificative pentru anul 2009:

Pentru etapa intermediara: **Rezultatul de baza a fost** realizarea unui model animal, care mimeaza afectiunile umane atat din punct de vedere metabolic cat si patofiziologic (cum ar fi lezarile celulare ce apar in ateroscleroza umana). Astfel, am aratat ca dieta cu colesterol, unt si NaCl administrata hamsterilor a fost eficienta in inducerea hipercolesterolemiei si hipertensiunii, modificari obtinandu-se atat la valorile inregistrate la parametri biochimici si tensiune arteriala; cat si la nivelul acumularii de lipide din peretele arterial si arcul aortic. Tratarea hamsterilor hipercolesterolemici-hipertensivi cu irbersartan s-a dovedit a avea efecte benefice, imbunatatind valorile obtinute pentru acesti parametri si de asemenea reducand acumularea de lipide la nivelul arterelor si a arcului aortic asociata cu cei doi factori de risc. In paralel cu modelul animal, au fost selectate si caracterizate loturile de pacienti luate in studiu.

Cunoscand ca ateroscleroza este o afectiune multifactoriala complexa, cu numeroase etiologii, ce actioneaza sinergetic pentru a promova dezvoltarea leziunii, noul model animal hamsterul hipertensiv-hipercolesterolemic(HH), care imita metabolic si patofiziologic afectiunile umane va ajuta la elaborarea de tratamente preventive sau de ameliorare a bolii.

Pentru etapa finala: **Rezultatele** au aratat ca, comparativ cu grupul C, HH a evidentiat o crestere marcata a MPs (EMPs, PMPs, LMPs) si o scadere semnificativa a EPC in corelatie directa cu cresterile semnificative obtinute in concentratiile plasmatice de colesterol si trigliceride, in presiunea sangelui sistolica si diastolica si in ritmul cardiac. In plus, experimentele au aratat potentialul irbersartanului de a corecta toti parametrii alterati in HH.

In concluzie, hipercolesterolemia asociata cu hipertensiunea este acompaniata de cresteri semnificative ale nivelelor plasmatice circulante de MPs (EMPs, PMPs, LMPs) si de reduceri substantiale de EPCs, relatia dintre ele putand fi considerata un marker al disfunctiei vasculare. Irbersartanul, antagonist al receptorului AT1, s-a dovedit a avea un control farmacologic important asupra nivelelor circulante de MPs si EPCs.

Rezultate semnificative pentru anul 2010:

Rezultatele au arata ca: in cazul hamsterilor, comparativ cu grupul control, la grupul HH s-au inregistrat: **(1)** modificari structurale (ingrosarea mediei si a laminei bazale, ingustarea intimei, activarea celulelor endoteliale si a celulelor musculare netede (SMC) si transformarea lor intr-un fenotip secretor, migrarea SMC din media in intima, incarcarea cu lipide a SMC, cresterea numarului de organite celulare, de elemente contractile, acumularea de colagen), ce sugereaza remodelarea vasculara a peretelui arterial; **(2)** prezenta MPs in peretele vascular arterial **(3)** expresie proteica modificata semnificativ a markerilor inflamatori specifici (*MMP-2, MMP-9, MMP-12, TIMP-1, TIMP-2, colagen de tip 1)* cu rol in migrarea SMC, hiperplazia intimei, remodelarea vasculara; **(4)** raspuns contractil redus al arteriolelor la noradrenalina (NA, 10^{-8} – 10^{-4} M), 5-hidroxitriptamina (5-HT, 10^{-8}-10^{-4}M) si potasiu (K^{+}, 24.4 mM, 42.46 mM, 64.1 mM, 83.93 mM, 123.7 mM); **(5)** vasodilatatie dependenta de endoteliu la acetilcolina (ACh, 10^{-8} – 10^{-4} M) si independenta de endoteliu la nitroprusiat de sodiu (SNP, 10^{-8} – 10^{-4} M) drastic reduse. In cazul pacientilor HH, indicele intima-medie si glezna-brat a fost alterat semnificativ comparativ cu acela masurat la subiectii sanatosi. De asemenea, placile de aterom, disfunctia endoteliala sunt prezente la pacientii HH. In plus, experimentele au aratat potentialul irbersartanului de a corecta toti parametrii alterati in HH.

In concluzie, hipercolesterolemia asociata cu hipertensiunea este acompaniata de alterari semnificative ale structurii si functiei peretelui arterial, de inflamatia acestuia, ce se coreleaza cu modificarile parametrilor biochimici, cu cresterile nivelelor plasmatice de MPs circulante (EMPs, PMPs, LMPs) si cu reduceri substantiale de EPCs, relatia dintre ele putand fi considerata un marker al disfunctiei

vasculare. De asemenea, moleculele pro-inflamatorii si MPs din peretele vascular sunt responsabile de aparitia modificarilor functionale la HH, iar tratamentul cu irbersartan, antagonist al receptorului AT1, s-a dovedit a avea un control farmacologic important.

Publicatii rezultate

An 2009

Articole în jurnale de specialitate cotate ISI

1. A.Georgescu, N.Alexandru, D.Popov, M. Amuzescu, E.Andrei, C.Zamfir, H.Maniu, A.Badila.Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles.Journal of Thrombosis and Haemostasis,7 (9):2009,1566-75- f.imp 6.3

2. D. Popov, M Nemecz, M. Dumitrescu, A. Georgescu, F.D. Böhmer. Long-term high glucose concentration influences Akt, ERK1/2, and PTP1B protein expression in human aortic smooth muscle cells. Biochem. Biophys ResearchCommunications, 388(1):51-55, 2009, f.imp 2,64.

Lucrari prezentate la manifestari stiintifice internationale

1. A. Georgescu, N. Alexandru, D. Popov, M. Amuzescu, E. Andrei, M. Nemecz, C. Zamfir, A. Badila, M. Simionescu. Elevation of endothelial and platelet microparticles in patients with chronic venous insufficiency, at *XXII Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis* , July 11-16 2009, Boston , USA.

2. L-D. Popov, M. Nemecz, M. Dumitrescu**,** A. Georgescu, F. D. Böhmer. Long time culture of human aortic smooth muscle cells in high glucose concentration up-regulates ERK1/2 activation and PTP1B protein expression, at *45th EASD Annual Meeting,* Vienna, Austria, 29.09.2009-02.10.2009, published in *Diabetologia*, 52, Suppl. 1, p.S515, nr. 1336, 2009.

Premii obtinute la manifestari stiintifice

1. Premiu oferit de Comitetul de premiere pentru "the ISTH 2009 Developing World Scientist Grants" pentru prezentarea: Elevation of endothelial and platelet microparticles in patients with chronic venous insufficiency. A. Georgescu, N. Alexandru, D. Popov, M. Amuzescu, E. Andrei, M. Nemecz, C. Zamfir, A. Badila, M. Simionescu, at *XXII Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis* , July 11-16 2009, Boston , USA.

An 2010

Articole în jurnale de specialitate cotate ISI

1. Sadri Chahed, Aurélie S. Leroyer, Mounir Benzerroug, David Gaucher, Adriana Georgescu, Serge Picaud, Jean-Sébastien Silvestre, Alain Gaudric, Alain Tedgui, Pascale Massin, Chantal M. Boulange. Increased vitreous shedding of microparticles in proliferative diabetic retinopathy stimulates endothelial proliferation. *Diabetes*, 59, 694-701, 2010.- *factor de impact 8.4*

2. Adriana Georgescu, Doina Popov, Anamaria Constantin, Miruna Nemecz, Nicoleta Alexandru, Daniel Cochior, Aura Tudor. Dysfunction of human subcutaneous FAT arterioles in obesity associated or not with Type 2 diabetes. *Clinical Science,* in press 2010 – *factor de impact 4.2*

3. Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Emanuel Dragan, Eugen Andrei, Adriana Georgescu. Platelets activation in hypertension associated with hypercholesterolemia; effects of irbersartan. *Journal of Thrombosis and Haemostasis,* in press 2010. – *factor de impact 6.4*

4. E. Badila, M. Bazac, C. Tirziu, D. Bartos, M. Dorobantu. "Are beta-blokers a therapeutic option in patients with advanced chronic heart failure and associated chronic obstructive pulmonary disease?" European Journal of Heart Failure 2010, 9 (suppl 1): - *factor de impact 3.6*

Articole în jurnale indexate în baze de date internationale (BDI)

1. Miruna Nemecz, Doina Popov, Adriana Georgescu. Phosphorylation/dephosphorylation signaling events in the aorta of streptozotocin-injected Golden Syrian Hamsters. *Annals of RSCB,* vol XV, issue 1, 28-34, 2010. (CNCSIS B+)

2. Doina Popov. Endothelial cell dysfunction in hyperglycemia: Phenotypic change, intracellular signaling modification, ultrastructural alteration and potential clinical outcomes. International Journal of Diabetes Mellitus doi:10.1016/j.ijdm.2010.09.002 2010.

3. M. Dorobantu, C. Tirziu, S. Ghiorghe, E. Gainoiu, D. Zamfir. The prevalence of peripheral arterial disease in relationship with cardiovascular risk factors. Romanian Journal of Internal Medicine, vol 47/no.4.

Carti publicate la edituri internationale

1.Adriana Georgescu, Felicia Antohe. Editor a unei monografii internationale 'From Vascular Cell Biology to Cardiovascular Medicine' publicata de RESEARCH SIGNPOST TRANSWORLD RESEARCH NETWORK, Trivandrum - 695023, Kerala, India, ISBN - 978-81-7895-503-2, in press 2010.

Carti publicate la edituri nationale

1. N. Alexandru. Disfunctia plachetara in imbatranire si patologia cardiovasculara, Editura Agir, Bucuresti,159 pagini, ISBN 978-973-720-289-5, 2010.

Capitole de carte

1. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov. Ongoing data on vascular endothelial cell dysfunction: an update. 'From Vascular Cell Biology to Cardiovascular Medicine', Ed: Adriana Georgescu, Felicia Antohe, published by RESEARCH SIGNPOST TRANSWORLD RESEARCH NETWORK, ISBN - 978-81-7895-503-2, in press 2010.

2. Elisabeta Badila, Maria Dorobantu, Daniela Bartos. Metabolic syndrome and arterial hypertension - pathogenic aspects. *'From Vascular Cell Biology to Cardiovascular Medicine'*, Ed: Adriana Georgescu, Felicia Antohe, published by ***RESEARCH SIGNPOST TRANSWORLD RESEARCH NETWORK,*** ISBN - 978-81-7895-503-2, **in press 2010.**

Rezumate aparute in jurnale ISI

1. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Eugen Andrei, Irina Titorencu, Emanuel Dragan, Cristina Tarziu, Silviu Ghiorghe, Elisabeta Badila, Daniela Bartos, Maya Simionescu. Ratio of microparticles to endothelial progenitor cells, a marker of vascular dysfunction induced by combined hypertension and hypercholesterolemia; irbersartan effect, 'the 78th European Atherosclerosis Society Congress', Hamburg, Germany, in Atherosclerosis Supplements, Volume 11, Issue 2, Page 12, June 20 - 23, 2010.- factor de impact 6.55

2. Nicoleta Alexandru, Adriana Georgescu, Doina Popov, Eugen Andrei, Emanuel Dragan, Maya Simionescu. Irbesartan reduces platelets activation in hypertensive-hypercholesterolemic hamster, 'the 78th European Atherosclerosis Society Congress', Hamburg, Germany, in Atherosclerosis Supplements, Volume 11, Issue 2, Page 181-182, June 20 - 23, 2010. factor de impact 6.55

3. C. Tirziu, A. Georgescu, E. Badila, S. Ghiorghe, D. Bartos. Can we use the ratio between circulating microparticules and endothelial progenitor cells like marker of the endothelial dysfunction in hypertensive-hypercholesterolemic patients?- 20th European Meeeting on Hypertension, June 18-21 2010, OSLO.- published in "Journal of Hypertension" vol 28 -Supplement A, June 2010.

4. E. Badila, S. Frunza, C. Tirziu, D. Bartos, M. Dorobantu. The bennefit of therapy using renin-20th European Meeeting on Hypertension, June 18-21 2010, OSLO.- published in "Journal of Hypertension" vol 28 -Supplement A, June 2010.

angiotensin system blokers in preventing recurrent atrial fibrilation in high risk hypertensive patients.

5. E. Badila, C. Tirziu, D. Bartos, M.Dorobantu. Predictors for endothelial dysfunction improvement in hypertensive patients. 20th European Meeeting on Hypertension, June 18-21 2010, OSLO.- published in "Journal of Hypertension" vol 28 -Supplement A, June 2010.

6. C. Tirziu, E. Duculescu, F. Mehic,D. Bartos. Clinical and cardiovascular risk profile in hypertensive patients with aortic sclerosis. 20th European Meeeting on Hypertension, June 18-21 2010, OSLO.- published in "Journal of Hypertension" vol 28 -Supplement A, June 2010.

Prezentari orale

1. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Emanuel Dragan, Eugen Andrei, Irina Titorencu, Maya Simionescu. Raportul dintre microparticulele circulante si celulele endoteliale progenitoare -un nou marker celular al disfunctiilor vasculare., pag 26, *Sesiunea Stiintifica Anuala a Societatii Romane de Biologie Celulara*, Constanta iunie, 2010.

2. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Eugen Andrei, Irina Titorencu, Emanuel Dragan, Cristina Tarziu, Silviu Ghiorghe, Elisabeta Badila, Daniela Bartos, Maya Simionescu. Ratio of microparticles to endothelial progenitor cells, a marker of vascular dysfunction induced by combined hypertension and hypercholesterolemia; irbersartan effect, '*the 78th European Atherosclerosis Society Congress',* Hamburg, Germany, *in Atherosclerosis Supplements*, Volume 11, Issue 2, Page 12, June 20 - 23, 2010.

3. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Eugen Andrei, Emanuel Dragan, Irina Titorencu, Maya Simionescu. Role of circulating microparticles and of endothelial progenitor cells in atherosclerosis; the pharmacological effects of irbersartan. Yearly Scientific Session. Workshop: Cellular and molecular biology for the human health. Bucharest, September 8, 2010.

Postere prezentate la Conferinte Internationale

1. Nicoleta Alexandru, Adriana Georgescu, Doina Popov, Eugen Andrei, Emanuel Dragan, Maya Simionescu. Irbesartan reduces platelets activation in hypertensive-hypercholesterolemic hamster, 'the 78th European Atherosclerosis Society Congress', Hamburg, Germany, in Atherosclerosis Supplements, Volume 11, Issue 2, Page 181-182, June 20 - 23, 2010.

2. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Eugen Andrei, Irina Titorencu, Emanuel Dragan, Maya Simionescu. Microparticles and endothelial progenitor cells as markers of vascular dysfunction induced by combined hypertension and hypercholesterolemia. Diaspora in scientific research and in high education. Exploratory Workshop: Tendencies and emergences in Stem Cell Biology and Embryology Research, Bucharest, September 22, 23, 2010.

Postere prezentate la Conferinte nationale

1. Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Eugen Andrei, Emanuel Dragan, Adriana Georgescu. Irbersartanul atenueaza modificarile plachetare induse de hipertensiunea asociata hipercolesterolemiei. A XXVIII-A Sesiune Stiintifica Anuala a Societatii Romane de Biologie Celulara, Constanta ,9- 12 iunie 2010, Buletinul SRBC, pag . 113.

Premii

1. Adriana Georgescu **-** Premiu oferit de Ministerul Educatiei si Cercetarii pentru articol publicat in 2009:Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Manuela Amuzescu, Eugen Andrei, Constantin Zamfir, Horia Maniu, Adrian Badila .Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis,* 7 (9): 1566-1575, 2009.

2. Adriana Georgescu - Premiul "Constantin Velican" pentru contributii remarcabile in domeniul patologiei celulare si moleculare a bolilor cardiovasculare, oferit la *A XXVIII-A Sesiune Stiintifica Anuala a Societatii Romane de Biologie Celulara,* Constanta, Romania, *9- 12 iunie* 2010.

3. Adriana Georgescu - Premiu oferit de Ministerul Educatiei si Cercetarii pentru articol publicat in 2010: Sadri Chahed, Aurélie S. Leroyer, Mounir Benzerroug, David Gaucher, Adriana Georgescu, Serge Picaud, Jean-Sébastien Silvestre, Alain Gaudric, Alain Tedgui, Pascale Massin, Chantal M. Boulange. Increased vitreous shedding of microparticles in proliferative diabetic retinopathy stimulates endothelial proliferation. *Diabetes*, 59, 694-701, 2010.

Indicatorii specifici directiei de cercetare 4: Sanatate

Ø **Concepte/studii ale mecanismelor de adaptare ale organismului;**

- Realizarea cu succes a unui model experimental animal.

- Adaptarea hamsterilor la noua dieta alimentara bogata in sare si colesterol.

Ø **Metode pe baze moderne de investigatie in medicina;**

- Stabilirea de noi biomarkeri celulari ai bolilor cardiovasculare si aterosclerozei la pacientii simptomatici si asimptomatici prin citometrie de flux.

- Investigarea tensiunii arteriale (sistolica si diastolica) la animale.

- Stabilirea disfunctiei vasculare la animale utilizand tehnica miografului computerizat.

- Tehnica de imunohistochimie pentru evidentierea unor markeri bilogici in placa atero.

- Tehnica Western Blott pentru cuantificarea epresiiilor proteice a moleculelor inflamatorii.

Ø **Terapii moderne;** metode de preventie si interventionale la nivel naţional, arondate la spaţiul european de operare

-Efectul benefic al irbersartanului (medicament antihipertensiv) in prevenirea si regresia aterosclerozei.

- Rolul pozitiv al EPCs in redresarea disfunctiei vasculare.

L'ACADEMIE ROUMAINE

INSTITUT DE BIOLOGIE ET PATHOLOGIE CELLULAIRE
"NICOLAE SIMIONESCU"

THESE DE DOCTORAT

Résumé

L'IMPLICATION DE L'ALARMINE HMGB1 DANS LES PROCESSUS INFLAMMATOIRES ASSOCIÉS AUX DYSFONCTIONNEMENTS VASCULAIRES DANS LE CADRE DE L'HYPERLIPIDÉMIE ET DU DIABÈTE EXPÉRIMENTAL

Directeur de recherche:

Dr. FELICIA ANTOHE

Doctorante:

RALUCA MARIA BOTEANU

BUCAREST

2012

SOMMAIRE

Introduction

Première partie
L'ÉTAT ACTUEL DES RECHERCHES

I. HMGB1 – Classifications, Structure et Localisation
1. La famille des protéines *high mobility group* (HMG)
   1.1. La famille des protéines HMGA
   1.2. La famille des protéines HMGB
   1.3. La famille des protéines HMGN
2. La structure de la protéine HMGB1
   2.1. Les domaines HMG *box*
   2.2. La région acide
   2.3. Les modifications post-translationnelles
3. La distribution de la protéine HMGB1
   3.1. La répartition HMGB1 au niveau tissulaire, cellulaire et subcellulaire
   3.2. La localisation extracellulaire de la protéine HMGB1
      3.2.1. La sécrétion active
      3.2.2. La libération passive

II. **Les récepteurs de la protéine HMGB1 et la signalisation intracellulaire**
1. Le récepteur des produits finaux de glycation avancée (RAGE)
2. Les récepteurs type *Toll*
3. Les protéoglycanes

4. La thrombomoduline

III. Les fonctions de la protéine HMGB1

1. La fonction nucléaire
2. La fonction de l'alarmine
   2.1. Les effets pro-inflammatoires de la protéine HMGB1
      2.1.1. HMGB1, l'hyperlipidémie et l'athérosclérose
      2.1.2. HMGB1 et le diabète de type 1
   2.2. Les effets régénératifs de la protéine HMGB1

Conclusions

Deuxième partie
CONTRIBUTIONS ORIGINALES

1. But et objectifs
2. La méthodologie expérimentale
3. Les études expérimentales

I. Le déclenchement, l'entretien et l'arrêt du processus inflammatoire initié par la protéine HMGB1 dans l'hyperlipidémie expérimentale

Introduction

Méthode expérimentale

1. L'analyse des paramètres biochimiques et des modifications morphologiques induites par l'hyperlipidémie.

Discussions

Conclusions

2. La diète hyperlipidémique stimule la libération de la protéine HMGB1

2.1. La détection de la protéine HMGB1 dans le sérum

2.2. La localisation subcellulaire de la protéine HMGB1 dans le tissu cardiaque

2.3. La répartition subcellulaire de la protéine HMGB1 dans le tissu pulmonaire.

Discussions
Conclusions
3. La signalisation par HMGB1 dans des conditions de stress hyperlipidémique
3.1. La détection du niveau du récepteur RAGE, de la kinase AKT1 et de son degré de phosphorylation dans le tissu cardiaque
3.2. L'identification et la quantification RAGE, AKT1 et phospho-AKT1 dans le tissu pulmonaire
Discussions
Conclusions
4. L'effet produit par la fluvastatine sodique sur la protéine HMGB1 dans l'hyperlipidémie induite expérimentalement.
4.1. L'expression génique et le niveau de la protéine HMGB1 dans le sérum et dans les tissus (cœur et poumon)
4.2. Quantification du récepteur RAGE dans le tissu cardiaque et pulmonaire.
4.3. La détermination du niveau d' AKT1 et phospho -AKT1 dans le tissu cardiaque et pulmonaire
Discussions
Conclusions

II. La modulation de l'expression des protéines et de l'alarmine HMGB1 dans les macrophages activés avec du sérum hyperlipidémique
Introduction
Méthode expérimentale
1. La répartition des lipides dans les macrophages U937 activés avec du sérum hyperlipidémique
Discussions
Conclusions
2. L'expression protéique de l'alarmine HMGB1 dans les macrophages U937 qui sont activés.
Discussions
Conclusions

3. L'imunodétection du récepteur RAGE et la caractérisation du rapport AKT1/ phospho-AKT1 dans les macrophages activés
Discussions
Conclusions

III. L'augmentation de l'expression de la protéine HMGB1 au niveau génique et protéique induit et maintient l'inflammation pulmonaire dans le cas du diabète sucré de type 1
Introduction
Méthode expérimentale
1. Preuves biochimiques et morphologiques associées au diabète de type 1 expérimentalement induit.
Discussions
Conclusions
2. L'expression génique et la distribution subcellulaire de la protéine HMGB1 dans le tissu pulmonaire
Discussions
Conclusions
3. L'identification des systèmes de signalisation activés par HMGB1 dans le tissu pulmonaire des souris ayant un diabète expérimental de type 1
3.1 L'évaluation de l'expression protéique du récepteur RAGE
3.2 La quantification du niveau de phosphorylation d'AKT
3.3 L'expression protéique du facteur de transcription NF-kB
Discussions
Conclusions

4. Conclusions générales

Bibliographie
La liste des ouvrages publiés et communiqués

MOTS-CLÉS

HMGB1

L’ALARMINE

PROCESSUS INFLAMMATOIRES

HYPERLIPIDÉMIE

DIABÈTE TYPE 1

RAGE

AKT1

NK-kB

SYSTÈME CARDIO-PULMONAIRE

*

Dans le résumé ci-dessous, sont présentés brièvement les objectifs, la méthodologie et les conclusions envisagées sur la base des résultats obtenus des études présentées dans la deuxième partie de la thèse, le chapitre CONTRIBUTIONS ORIGINALES.

But et objectifs

But:

Les études effectuées dans cette thèse visent à rendre compte du rôle et de la manière dont la protéine HMGB1 intervient dans le processus inflammatoire installé dans des conditions hyperlipidémiques – athérosclérotiques et de diabète type 1 expérimentalement induit.

Objectifs:

a. L'analyse de la distribution cellulaire et subcellulaire de la protéine HMGB1 dans le système cardio-pulmonaire soumis au processus inflammatoire déjà existant dans des conditions hyperlipidémiques.

b. La contribution de l'alarmine HMGB1 dans la signalisation cellulaire présente dans l'inflammation induite par le stress hyperlipidémique.

c. L'étude de la protéine HMGB1 dans les macrophages activés par l'incubation au sérum hyperlipémique.

d. L'analyse de la molécule HMGB1 du point de vue génique et protéique à la suite de l'administration du traitement avec fluvastine sodique aux animaux qui ont des plaques athérosclérotiques développées par une diète hyperlipidémique.

e. L'évaluation de l'effet induit par l'administration de la fluvastine sodique sur les protéines de la cascade de signalisation initiée par HMGB1 pendant l'hyperlipidémie induite expérimentalement.

f. L'investigation de la localisation de la protéine HMGB1 dans le tissu pulmonaire soumis à l'hyperglycémie de stress du diabète sucré type 1.

g. La détection des moyens de signalisation activés par l'alarmine HMGB1 dans le pulmonaire diabétique.

- Méthodologie expérimentale

1. Modèles expérimentales
   1.1 Le hamster hyperlipidémique
   1.2 Les souris ayant un diabète type 1 induit expérimentalement
   1.3 Les cultures cellulaires
2. Cryosections
3. Microscopie électronique
4. Déterminations biochimiques
5. La technique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)
6. L'extraction de protéines
7. L'électrophorèse SDS-PAGE
8. Technique Western blot
9. L'isolation ARN total
10. Real Time PCR semi-quantitative
11. L'analyse statistique

- Conclusions générales

Les résultats des études effectuées dans cette recherche ont montré que:

1 – La diète hyperlipidémique peut induire la libération de l'alarmine HMGB1 dans le sérum, en lui attribuant le statut de marqueur des événements athérosclérotiques déclenchés ultérieurement par l'état hyperlipidémique.

2 – L'expression génique accrue et le niveau protéique élevé de l'alarmine HMGB1 dans l'extrait protéique qui provient du cœur des animaux hyperlipidémiques , indiquent l'existence du processus inflammatoire au niveau de cet organe.

3 – Le poumon des animaux hyperlipidémiques a montré une croissance de l'expression génique et un niveau élevé de la protéine HMGB1 dans les deux

fractions protéiques subcellulaires analysées, tout en signalant la présence de l'inflammation tissulaire.

4 – La liaison démontrée entre HMGB1 et l'hyperlipidémie expérimentale offre à l'alarmine le statut de cible incontestable de la stratégie thérapeutique utilisée afin d'améliorer l'état clinique du patient et également pour une évolution positive du patient.

5 – Dans le tissu cardiaque et pulmonaire l'expression protéique accrue de la protéine HMGB1 entre en corrélation positive avec le niveau élevé du récepteur RAGE et avec la forte phosphorylation de la kinase AKT. Toutes ces données nous fournissent la possibilité d'affirmer que dans le cas des animaux hyperlipidémiques, l'interaction HMGB1 – RAGE peut maintenir le processus inflammatoire par l'activation du système de signalisation PI3K/ AKT.

6 – Les résultats obtenus apportent des informations nouvelles pour la compréhension des mécanismes qui sont à la base du processus inflammatoire déclenché par les perturbations du métabolisme lipidique et entretenu par la protéine HMGB1.

7 – L'administration de la fluvastine aux animaux qui ont subi au départ une diète hyperlipidémique a eu un effet positif au niveau du tissu cardiaque, effet traduit par l'arrivée de la molécule HMGB1 à un niveau génique semblable à celui détecté sur les animaux cobayes control.

8 – Le traitement avec la fuvastine a eu le même effet positif sur le récepteur RAGE et sur la kinase AKT1 phosphorilates. Ainsi, la conséquence majeure de ces événements moléculaires générés par l'action de la fluvastine est représentée par la diminution de la synthèse de novo des molécules pro-inflammatoires, inclus la RAGE et le HMGB1, ayant comme conséquence la diminution de l'inflammation tissulaire.

9 – Une autre nouveauté que nous avons réussi à démontrer est représentée par la capacité de la fluvastine à réduire de manière significative la concentration sérique de l'alarmine HMGB1.

10 – Nous avons pu enregistrer la diminution de l'expression génique et protéique de la molécule HMGB1, dans le tissu pulmonaire chez les animaux control. Egalement, le niveau du récepteur RAGE et le degré de phosphorylation de la kinase AKT ont été diminués de manière significative, en troublant ainsi l'interaction HMGB1-RAGE et implicitement la signalisation par PI3K/AKT, qui active le facteur de transcription NF-kB. Ainsi, le niveau des cytokines pro-inflammatoires diminuera et le processus inflammatoire perdra également son intensité.

11 – Les expérimentations effectuées apportent des nouvelles preuves qui soutiennent l'hypothèse que l'alarmine HMGB1 fonctionne comme un médiateur de l'inflammation systémique généré pendant le stress hyperlipidémique.

12 – Le modèle expérimental *in vitro* proposé, s'intègre dans la catégorie des modèles utilisés dans l'étude des cellules spumeuses qui sont à l'origine du processus d'athérosclérose.

13 – Le sérum hyperlipidémique induit la translocation de l'alarmine HMGB1 du noyau en cytoplasme, processus démontré par la quantité significativement réduite de HMGB1 dans le noyau mais élevé dans le cytoplasme des macrophages pour qu'à la fin HMGB1 soit sécrétée dans le milieu extracellulaire.

14 – Les résultats obtenus rendent possible l'introduction de la protéine HMGB1 sur la liste de cytokines impliqués dans la pathogénie de l'athérosclérose, tout en ayant en vue sa relocalisation subcellulaire dans les macrophages chargés de lipides ce qui indique le rôle important de l'alarmine HMGB1 des étapes préliminaires au processus athérosclérotique.

15 – Les macrophages activés avec du sérum hyperlipidémique expriment sur leur surface le récepteur RAGE dans une quantité plus considérable que les cellules control. Dans le même contexte hyperlipidémique a été mis en évidence le système de signalisation PI3K/AKT chez les macrophages activés, par la phosphorylation de la kinase AKT à la thréonine de la position 308.

16 – Les résultats de l'étude *in vitro* représentent une preuve incontestable que HMGB1 est un médiateur important de l'inflammation déclenchée par le stress hyperlipidémique et que son blocage pourrait envisager un ralentissement du processus athérogénique.

17 Les animaux doubles transgéniques ont souffert pendant 8 semaines de divers déséquilibres métaboliques et somatiques qui ont conduit à l'installation du diabète sucré type 1, en représentant ainsi, un choix conforme aux exigences de l'expérimentation.

18 – Les modifications biochimiques produites aux animaux dTg, représentées surtout par le niveau glycémique élevé ont généré à ces animaux un manque d'énergie expliqué par le manque de l'insuline qui assure le nécessaire énergétique des cellules. Cet état a amené implicitement à une perte de poids de ces animaux diabétiques.

19 – La morphologie atypique de l'endothélium vasculaire pulmonaire détectée chez les souris dTg et le niveau élevé de la protéine HMGB1 dans le poumon diabétique expliqués par synthèse élevée de HMGB1 et par sa translocation du noyau vers le cytosol, indiquent l'existence du processus inflammatoire au niveau de ce tissu.

20 – Le processus inflammatoire mis en évidence dans le poumon diabétique, est maintenu et par la suite amplifié par les systèmes de signalisation activés par l'alarmine HMGB1. Ainsi, nous n'avons pas signalé seulement le niveau élevé du récepteur RAGE dans le tissu pulmonaire des souris mais aussi, son activation mise en évidence par la phosphorylation de la kinase AKT1 et par le niveau élevé de la sous-unité p65 du facteur de transcription NF-kB. Etant donné le fait que le facteur nucléaire kappa b est impliqué dans la synthèse de novo du récepteur RAGE mais aussi de l'alarmine HMGB1, nous considérons que dans le poumon diabétique est induit un état inflammatoire qui peut acquérir l'ampleur nécessaire afin de produire des modifications histologiques tissulaires et ainsi, d'affecter la fonction pulmonaire.

21 – A la lumière de ces données de même qu'aux implications qu'elles entrainent, des éventuelles thérapies qui ciblent le blocage de l'alarmine HMGB1 pourraient être essentielles dans la diminution des complications cardio-vasculaires associées à l'hyperlipidémie et au diabète.

ROMANIAN ACADEMY

INSTITUTE OF CELLULAR BIOLOGY AND PATHOLOGY „NICOLAE SIMIONESCU"

PhD THESIS

Summary

INVOLVEMENT OF ALARMIN HMGB1 IN INFLAMMATORY PROCESSES ASSOCIATED WITH VASCULAR DYSFUNCTION IN HYPERLIPIDEMIA AND EXPERIMENTAL DIABETES

Scientific Coordinator:

Dr. FELICIA ANTOHE

PhD Student:

RALUCA MARIA BOTEANU

BUCHAREST

2012

TABLE OF CONTENTS

Introduction

Part I
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

I. HMGB1 – Classification, Structure and Localization

1. High mobility group (HMG) proteins family
   1.1. HMGA protein family
   1.2. HMGB protein family
   1.3. HMGN protein family
2. Structure of HMGB1
   2.1. HMG box domains
   2.2. Acidic region
   2.3. Posttranslational modifications
3. Distribution of HMGB1
   3.1. Repartition of HMGB1 in tissue, cellular and subcellular level
   3.2. Extracellular localization of HMGB1
      3.2.1. Active secretion
      3.2.2. Passive release

II. HMGB1 receptors and intracellular signaling

1. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)
2. Toll-like receptors
3. Proteoglycans
4. Thrombomodulin

III. HMGB1 functions

1. Nuclear function

2. Alarmin function

2.1. Pro-inflammatory effects of HMGB1 protein

2.1.1. HMGB1, hyperlipidemia and atherosclerosis.

2.1.2. HMGB1 and type 1 diabetes

2.2. Regenerative effects of HMGB1protein

Conclusion

Part II

ORIGINAL CONTRIBUTIONS

1. Aim and objectives

2. Experimental procedures

3. Experimental studies

I. Control of the inflammatory process initiated by HMGB1 protein in experimental hyperlipidemia.

Introduction

Experimental method

1.Evaluation of biochemical parameters and morphological changes induced by hyperlipidemia

Discussion

Conclusion

2. Hyperlipidemic diet stimulates the release of HMGB1protein

2.1. HMGB1 protein detection in serum

2.2. Subcellular localization of HMGB1 protein in cardiac tissue

2.3. Subcellular repartition of HMGB1 protein in pulmonary tissue

Discussion

Conclusion

3. HMGB1 signaling in hyperlipidemic stress conditions

3.1. Detection of RAGE, the kinase AKT1 and its degree of phosphorylation in heart tissue.

3.2. Identification and quantification of RAGE, AKT1 and phospho-AKT1 in lung tissue

Discussion

Conclusion

4. Effect of fluvastatin on HMGB1 protein expression in experimentally induced hyperlipidemia

4.1. Gene and protein expression of HMGB1in serum and tissues (heart and lung)

4.2. Quantification of RAGE receptor in heart and lung tissue.

4.3. Detection of AKT1 and phospho-AKT1 in heart and lung tissue

Discussion

Conclusion

II. Modulation of protein expression of the alarmin HMGB1 in activated macrophages by hyperlipidemic serum

Introduction

Experimental method

1. The distribution of lipids in U937 macrophages activated by hyperlipidemic serum

Discussion

Conclusion

2. Protein expression of the alarmin HMGB1 in activated macrophages

Discussion

Conclusion

3. Immunodetection of RAGE and the characterization of AKT1/ phospho-AKT1 ratio in activated macrophages

Discussion

Conclusion

III. Increased expression of HMGB1 induce and maintain pulmonary inflammation in type 1 diabetes

Introduction

Experimental method

1. Biochemical and morphological evidence associated with experimentally induced type 1 diabetes

Discussion

Conclusion

2. Gene expression and subcellular distribution of HMGB1 protein in lung tissue

Discussion

Conclusion

3. Identification of signaling pathways activated by HMGB1 in mice lung tissue with experimental diabetes type 1

3.1 Evaluation of RAGE protein expression

3.2 Quantification of phospho-AKT1 level

3.3 NF-κB Protein Expression

Discussion

Conclusion

4. General conclusions

References

List of original publication

KEYWORDS

HMGB1

ALARMIN

INFLAMMATORY PROCESSES

HYPERLIPIDEMIA

DIABETES TYPE 1

RAGE

AKT1

NK-kB

CARDIOPULMONARY SYSTEM

*

In this summary, the objectives, methodology and general conclusions based on the results obtained from the studies included in Part II of the paper, the original contributions, are briefly presented.

Aim and objectives

Aim:

To determine the role and how HMGB1 protein acts in the inflammatory process installed in hyperlipidemic - atherosclerosis conditions and diabetes type I induced experimentally.

Objectives:

a. To analyze the cellular and subcellular distribution of HMGB1 protein in cardiopulmonary system under existing inflammatory process in hyperlipidemic conditions.

b. Assess the contribution of alarmin HMGB1 in inflammatory cell signaling induced by hyperlipidemic stress.

c. Study the HMGB1 protein expression in macrophages activated by exposure to hyperlipidemic serum.

d. Examine the gene and protein expression of HMGB1 after treatment with fluvastatin sodium in animals which developed atherosclerotic plaque through hyperlipidemic diet.

e. Evaluate the fluvastatin effect on HMGB1 signaling cascade during experimentally induced hyperlipidemia.

f. Investigate the HMGB1 protein localization in lung tissue under hyperglycemic stress in type 1 diabetes.

g. Detect the signaling pathways activated by HMGB1 in diabetic lung.

Experimental methodology

1. Experimental models
   1.1 Hyperlipidemic hamster
   1.2 Mouse model of type 1 diabetes
   1.3 Cell culture
2. Cryosections
3. Electron microscopy
4. Biochemical analysis
5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
6. Protein extraction
7. SDS-PAGE Electrophoresis
8. Western blot
9. RNA isolation
10. Quantitative real-time polymerase chain reaction
11. Statistical analysis

General conclusions

Results obtained from the studies achieved in this thesis showed that:

1 – Hyperlipidemia can induce the release of HMGB1 in serum, leading to a situation in which the alarmin HMGB1 acts as a marker of atherosclerotic events that occur after a hyperlipidemic diet.

2 – Increased gene expression and high protein level of alarmin HMGB1 in the heart of hyperlipidemic animal, revealed the existence of the inflammatory process. .

3 – The lung of hyperlipidemic animals showed an increase of HMGB1 gene and protein expression in both subcellular protein fractions analyzed, signaling the presence of tissue inflammation.

4 – The demonstrated link between HMGB1 and experimental hyperlipidemia gives the alarmin a certain target status for therapeutic strategy used to improve the clinical condition for a favorable evolution of the patient.

5 – In the heart and lung tissue, the increased HMGB1 protein expression correlates positively with high levels of RAGE and a strong phosphorylation of AKT. This new data demonstrated for the first time that in hyperlipidaemic animals, HMGB1 - RAGE interaction maintains the inflammatory process by activating PI3K/ AKT signaling pathway.

6 – The results provide new information for understanding the mechanisms underlying inflammatory process triggered by disturbances of lipid metabolism maintained by HMGB1 protein.

7 – Fluvastatin treatment of the animals fed initially with hyperlipidemic diet had a positive impact on cardiac tissue by bringing the expression of HMGB1 gene and protein at a level similar to that detected in control animals.

8 –The fluvastatin treatment had the same positive effect on RAGE and phosphorylated AKT1. Thus, the major consequence of these molecular events generated by the action of fluvastatin is represented by decreasing *de novo* synthesis of pro-inflammatory molecules, including RAGE and HMGB1, having as consequence the reduction of tissue inflammation.

9 – Another element of novelty demonstrated is the ability of fluvastatin to reduce significantly the serum concentrations of alarmin HMGB1.

10 – Gene and protein expression of HMGB1 in lung tissue of treated animals were decreased. Furthermore, RAGE and phosphorylation level of AKT were significantly reduced, which affected HMGB1-RAGE interaction and therefore the PI3K/AKT signaling, which activates the transcription factor NF-kB. Thus, the pro-inflammatory cytokines will fall and with them the inflammatory process will lose its intensity.

11 – The experiments provide further evidence supporting the hypothesis that alarmin HMGB1 acts as a mediator of systemic inflammatory stress generated during hyperlipidemia.

12 – The *in vitro* experimental model proposed fits to the category of models used in the study of foam cells, a cell population present mainly within atherosclerotic lesions.

13 – The hyperlipidemic serum induce HMGB1 translocation from the nucleus into the cytoplasm, a process demonstrated by the significantly reduced amount of HMGB1 in the nucleus, but increased in the cytosol of macrophages, and finally secreted in the extracellular environment.

14 – The results make possible the introduction of HMGB1 on cytokines list involved in the pathogenesis of atherosclerosis; its subcellular relocation in macrophages loaded with lipids, indicating the existence of an important role of alarmin HMGB1 since the early stages of atherosclerosis.

15 – Macrophages activated with hyperlipidemic serum expressed on their surface RAGE in a higher quantity than control cells. In this hyperlipidemic context, the activation of PI3K/AKT signaling pathway was proved in activated macrophages by AKT phosphorylation on threonine 308.

16 – *In vitro* findings are clear evidence that HMGB1 is an important mediator of inflammation triggered by hyperlipidemic stress; blocking the HMGB1 release could be a feasible method to slow the atherosclerotic process.

17 – Double transgenic animals suffered during eight weeks various metabolic and somatic disorders leading to the onset of diabetes type 1, representing a choice conform to the requirements of the experiment.

18 – Biochemical changes produced in dTg animals were represented mostly by the high glycemic condition and luck of energy, explained by decreased insulin secretion. This condition implicitly led to weight loss of diabetic animals.

19 – Atypical morphology of pulmonary endothelium and high levels of HMGB1 protein detected in diabetic lung of dTg mice, which is explained by the high rate of synthesis and the translocation of HMGB1 from the nucleus to the cytosol, indicate the existence of the inflammatory process in the tissue.

20 –The inflammatory process revealed in diabetic lung is maintained and further enhanced by signaling pathways activated by HMGB1. Besides the high levels of RAGE in lung tissue of diabetic mice, the results demonstrated its activation by AKT phosphorylation and the high expression level of p65 subunit of NF-kB transcription factor. Because nuclear factor kB is involved in *de novo* synthesis of both RAGE and HMGB1, we consider that in diabetic lung was induced an inflammatory condition that can gain the amplitude necessary to produce changes in tissue histology and lung function impairment.

21 – In light of these data and their implications, possibly targeted therapies that block alarmin HMGB1 may be essential for reducing cardio-respiratory complications associated with hyperlipidemia and diabetes.

ACADEMIA ROMÂNA

INSTITUTUL DE BIOLOGIE SI PATOLOGIE CELULARA „NICOLAE SIMIONESCU”

TEZĂ DE DOCTORAT

Rezumat

IMPLICAREA ALARMINEI HMGB1 ÎN PROCESELE INFLAMATORII ASOCIATE DISFUNCŢIILOR VASCULARE ÎN HIPERLIPIDEMIA ŞI DIABETUL EXPERIMENTA

Conducator Ştiinţific:

Dr. FELICIA ANTOHE

Doctorand: RALUCA MARIA BOTEANU

BUCUREŞTI

- 2012 -

INTRODUCERE

In ultimii ani, au fost detectate cateva proteine endogene capabile sa indice celulele si tesuturile lezionate. Aceste proteine pot initia raspunsuri inflamatorii si au fost clasificate din anul 2006, sub denumirea de alarmine (Bianchi M.E., 2007). Alarmina *high mobility group box 1* (HMGB1) a fost studiata si implicata in numeroase patologii, dar rolul ei nu a fost, inca, pe deplin inteles, ceea ce ne-a determinat ca in aceasta lucrare sa investigam modul in care proteina HMGB1 intervine in procesul inflamator prezent in hiperlipidemia si diabetul tip 1 indus experimental.

HMGB1 este o proteina nucleara cu o mobilitate crescuta si numeroase functii desfasurate la nivelul nucleului, dar care surprinzator detine un rol extracelular foarte important, reprezentat de capacitatea de a semnaliza distrugerea celulara si tisulara. Studiile realizate pana in acest moment au aratat ca proteina HMGB1 intervine in patogenia bolilor care prezinta, mai ales, stari inflamatorii acute si cronice. Totusi, exista numerose intrebari fara raspuns in acest moment, cu privire la modalitatile prin care alarmina HMGB1 induce si intretine inflamatia. Astfel, am considerat esentiala realizarea unor experimente care sa ne permita cunoastera si intelegerea modului in care proteina HMGB1 este implicata in mecanismele moleculare care intervin in declansarea si mentinerea proceselor inflamatorii asociate disfunctiilor vasculare din starea hiperlipidemica si diabetica.

Lucrarea de doctorat este structurata in doua parti, care cuprind in total 7 capitole, 68 figuri si 3 tabele. Prima parte, consacrata cunostintelor actuale in domeniul abordat, include 2 tabele si 20 figuri, dintre care 4 sunt originale, fiind realizate pe baza datelor din literatura, iar restul de 16 figuri sunt modificate sau preluate ca atare, mentionandu-se de fiecare data in text sursa si prelucrarile suferite. In partea a doua, atribuita contributiilor originale se gasesc un tabel si 48 figuri originale, insumand grafice, diagrame, electroforeze si montaje cu imagini de microscopie optica sau electonica. Teza contine 227 titluri bibliografice si are urmatorul cuprins:

CUPRINS

Introducere

Partea I
STADIUL ACTUAL AL CUNOSTINTELOR

I. HMGB1 – Clasificare, Structura si Localizare

1. Familia proteinelor high mobility group (HMG)
   1.1. Familia de proteine HMGA
   1.2. Familia de proteine HMGB
   1.3. Familia de proteine HMGN
2. Structura proteinei HMGB1
   2.1. Domeniile HMG box
   2.2. Regiunea acida
   2.3. Modificari post-translationale
3. Distributia proteinei HMGB1
   3.1. Repartitia HMGB1 la nivel tisular, celular si subcelular
   3.2. Localizarea extracelulara a proteinei HMGB1
      3.2.1. Secretia activa
      3.2.2. Eliberarea pasiva

II. Receptori proteinei HMGB1 si semnalizarea intracelulara

1. Receptorul produsilor finali de glicare avansata (RAGE)
2. Receptorii tip Toll
3. Proteoglicani
4. Trombomodulina

III. Functiile proteinei HMGB1

1. Functia nucleara
2. Functia de alarmina
   2.1. Efectele proinflamatorii ale proteinei HMGB1
      2.1.1. HMGB1, hiperlipidemia si ateroscleroza
      2.1.2. HMGB1 si diabetul tip1
   2.2. Efectele regenerative ale proteinei HMGB1

Concluzii

Partea a II-a
CONTRIBUTII ORIGINALE

1. Scop si obiective

2. Metodologie experimentala

3. Studii experimentale

I. Declansarea, intretinerea si stoparea procesului inflamator initiat de proteina HMGB1 in hiperlipidemia experimentala

Introducere

Metoda experimentala

1. Analiza parametrilor biochimici si a modificarilor morfologice la hamsterii hiperlipidemici

Discutii

Concluzii

2. Dieta hiperlipidemica stimuleaza eliberarea proteinei HMGB1

2.1. Detectia proteinei HMGB1 in ser

2.2. Localizarea subcelulara a proteinei HMGB1 in tesutul cardiac

2.3. Repartitia subcelulara a proteinei HMGB1 in tesutul pulmonar

Discutii

Concluzii

3. Semnalizarea prin HMGB1 in conditii de stres hiperlipidemic

3.1. Detectia nivelului receptorului RAGE, a kinazei AKT1 si a gradului ei de fosforilare in tesutul cardiac

3.2. Identificarea si cuantificarea RAGE, AKT1 si fosfo-AKT1 in tesutul pulmonar

Discutii

Concluzii

4. Efectul produs de fluvastatina sodica asupra proteinei HMGB1 in hiperlipidemia indusa experimental

4.1. Expresia genica si nivelul proteinei HMGB1 in ser, inima si plaman

4.2. Cuantificarea receptorului RAGE in tesutul cardiac si pulmonar

4.3. Determinarea nivelului de AKT1 si fosfo-AKT1 in tesutul cardiac si pulmonar

Discutii
Concluzii

II. **Modularea expresiei proteice a alarminei HMGB1 in macrofagele activate cu ser hiperlipidemic reprezinta o etapa importanta a procesului inflamator**

Introducere
Metoda experimentala

1. Repartitia lipidelor in macrofagele U937 activate cu ser hiperlipidemic

Discutii
Concluzii

2. Expresia proteica a alarminei HMGB1 in macrofagele U937 activate cu ser hiperlipidemic

Discutii
Concluzii

3. Imunodetectia receptorului RAGE si caracterizarea raportului AKT1/ fosfo-AKT1 in macrofagele activate cu ser hiperlipidemic

Discutii
Concluzii

III. **Cresterea expresiei proteinei HMGB1 la nivel genic si proteic induce si mentine inflamatia pulmonara in diabetul zaharat tip I**

Introducere
Metoda experimentala

1. Analiza parametrilor biochimici si a modificarilor morfologice la animalele luate in studiu

Discutii
Concluzii

2. Expreisa genica si distributia subcelulara a proteinei HMGB1 in tesutul pulmonar

Discutii
Concluzii

3. Identificarea cailor de semnalizare activate de HMGB1 in tesutul pulmonar al soarecilor cu diabet experimental tip I
   3.1. Evaluarea expresiei proteice a receptorului RAGE
   3.2. Cuantificarea nivelului de fosforilare a AKT

3.3. Expresia proteica a factorului de transcriere NF-Kb

Discutii

Concluzii

4. Concluzii generale

Bibliografie

Lista lucrarilor publicate si comunicate

*

In rezumatul de fata sunt prezentate pe scurt obiectivele, metodologia si concluziile generate pe baza rezultatelor obtinute in urma studiilor cuprinse in partea a II-a a lucrarii, **CONTRIBUTII ORIGINALE**.

Scop si obiective

Scop:

Studiile realizate in aceasta teza au urmarit rolul si modul in care proteina HMGB1 intervine in procesul inflamator instalat in conditii hiperlipidemice – aterosclerotice si de diabet tip I indus experimental.

Obiective:

a. Analiza distributiei celulare si subcelulare a proteinei HMGB1 in sistemul cardio-pulmonar supus procesului inflamator existent in conditii hiperlipidemice.

b. Contributia alarminei HMGB1 in semnalizarea celulara prezenta in inflamatia indusa de stresul hiperlipidemic.

c. Studierea proteinei HMGB1 in macrofagele activate prin expunere la serul hiperlipidemic.

d. Examinarea moleculului HMGB1 din punct de vedere genic si proteic dupa administrare tratamentului cu fluvastatina sodica la animalele cu placi aterosclerotice dezvoltate prin dieta hiperlipidemica.

e. Evaluarea efectului indus de admistrarea fluvastatinei sodice asupra proteinelor din cascada de semnalizare initiata de HMGB1 in timpul hiperlipidemiei induse experimental.

f. Investigarea localizarii proteinei HMGB1 in tesutul pulmonar supus stresului hiperglicemic din diabetul zaharat tip 1.

g. Detectia cailor de semnalizare activate de alarmina HMGB1 in palmanul diabetic.

Metodologie experimentala

1. Modele experimentale

   1.1 Hamsterul hiperlipidemic

   1.2 Soareci cu diabet tip 1 indus experimental

   1.3 Culturi celulare

2. Criosectiuni
3. Microscopie electronica
4. Determinari biochimice
5. Tehnica ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)
6. Extractia de proteine
7. Electroforeza SDS-PAGE
8. Tehnica Western blot
9. Izolare ARN total
10. Real Time PCR semi-cantitativ
11. Analiza Statistica

Concluzii generale

Rezultatele studiilor efectuate in aceasta lucrare au aratat ca:

1 – Dieta hiperlipidemica poate induce eliberarea alarminei HMGB1 in ser, conferidu-i statutul de marker al evenimetelor aterosclerotice declansate ulterior de starea hiperlipidemica.

Pentru a demonstra daca dieta hiperlipidemica afecteaza cantitatea de HMGB1, s-a masurat, nivelul seric de HMGB1, folosind tehnica ELISA de captura. Valorile detectate pentru HMGB1 seric la hamsterii control (C) au fost in limite normale, de 4,2 ± 1,09 ng/ml. In schimb, hamsterii cu dieta hiperlipidemica (H) au avut concentratia serica de HMGB1 de 5 ori mai mare (21.2 ± 9.6 ng/ml; $p < 0.01$), comparativ cu grupul control (Fig. 30).

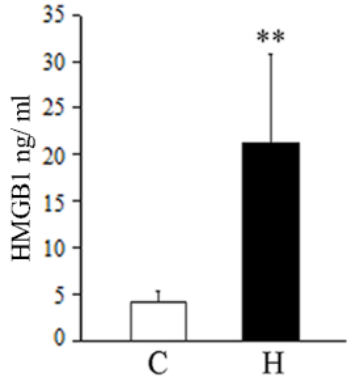


Fig. 1 Concentratia de HMGB1 detectata in serul animalelor hiperlipidemice prin metoda ELISA captura. Datele sunt prezentate ca medie ± SD; p** < 0,01 vs. C

2 – Expresia genica crescuta si nivelul proteic ridicat al alarminei HMGB1 in extractul proteic provenit din inima animalelor hiperlipidemice, indica existenta procesului inflamator la nivelul acestui organ.

La hamsterii hiperlipidemici s-a detectat ca expresia genei Hmgb1, izolat din ventriculul stang, creste de 1,89 ori fata de hamsterii control (Fig. 2*a*).

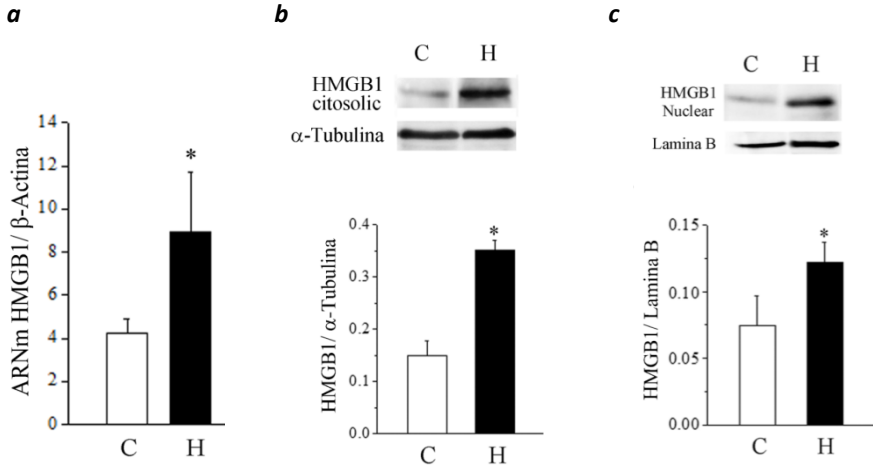


Fig. 2 HMGB1 in tesutul cardiac *(a)* Nivelul ARNm al HMGB1. *(b)* Identificarea prin *Western blot* a proteinei HMGB1 in fractia imbogatita in proteine citosolice *(c)*. Imuno-transfer reprezentativ pentru HMGB1 in fractia nucleara. Pentru normalizarea rezultatelor s-au folosit β-Actina, α Tubulina si respectiv Lamina B. Datele sunt prezentate ca medie ± SD; p* < 0,05 vs. C.

Datele obtinute prin *Western blot* au aratat ca la hamsterii hiperlipidemici nivelul de HMGB1 din fractia imbogatita in proteine citosolice, creste semnificativ ($p < 0,05$), acesta fiind de 2,35 ori mai mare comparativ cu animalele din grupul C (Fig. 2*b*), iar in fractiile imbogatite in proteine nucleare nivelul proteinei HMGB1 detectat a fost de 1.63 ori mai mare decat cel obtinut la hamsterii din grupul control (Fig. 2*c*).

3 – Plamanul animalelor hiperlipidemice a aratat o crestere a expresie genice si un nivel ridicat al proteinei HMGB1 in cele doua fractii proteice subcelulare analizate, semnalizand prezenta inflamatiei tisulare.

La animale hiperlipidemice, expresia genei Hmgb1 a inregistrat o crestere de 1,58 ori ($p < 0.05$) fata de animalele control. De asemenea, in fractia imbogatita in proteine citosolice a grupului H, nivelul proteinei HMGB1 este de 4.42 ori mai mare decat in cea a grupului C (Fig. 3*a*), iar in fractia nucleara a existat o

crestere semnificativa (p < 0,05) de 1,64 ori la hamsterii hiperlipidemici fata de grupul control (Fig. 3*b*).

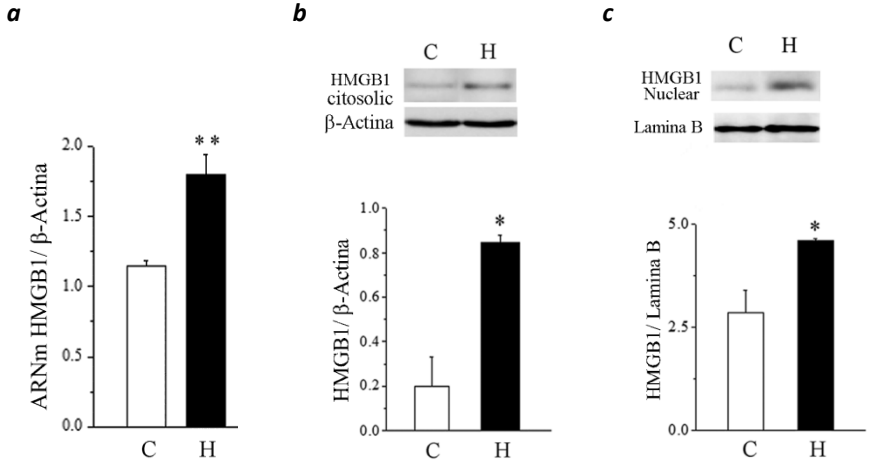


Fig. 3 Detectia proteinei HMGB1 in tesutul pulmonar. *(a)* Expresia genica a moleculei HMGB1 *(b)* Identificarea prin *Western blot* a proteinei HMGB1 in fractia imbogatita in proteine citosolice *(c)*. Imuno-transfer reprezentativ pentru HMGB1 in fractia nucleara. Pentru normalizarea rezultatelor s-au folosit β-Actina si respectiv lamina B. Datele sunt prezentate ca medie ± SD; p* < 0,05 vs. C, p** < 0,01 vs. C.

4 – Legatura demonstrata dintre HMGB1 si hiperlipidemia experimentala, ii ofera alarminei statutul de tinta certa a strategiei terapeutice folosita in vederea imbunatatirii starii clinice si pentru o evolutie favorabila a pacientului.

5 – In tesutul cardiac si pulmonar expresia proteica crescuta a proteinei HMGB1 se coreleaza pozitiv cu nivelul ridicat al receptorului RAGE si cu fosforilarea puternica a kinazei AKT. Aceste date ne ofera posibilitatea sa afirmam pentru prima data ca la animalele hiperlipidemice, interactiunea HMGB1 – RAGE poate mentine procesul inflamator prin activarea caii de semnalizare PI3K/ AKT.

Rezultatele obtinute au aratat ca in conditii hiperlipidemice nivelul receptorului RAGE creste semnificativ (p < 0.05), atat in inima cat si in tesutul

pulmonar, acesta fiind de 2,37 si respectiv 1,8 ori mai mare decat nivelul detectat la grupul C. In tesuturile analizate s-a putut observa la animalele H o fosforilare notabila a AKT1 la Thr^{308}, acesta fiind de 10 ori mai mare in tesutul cardiac si de 6 ori mai mare in cel pulmonar.

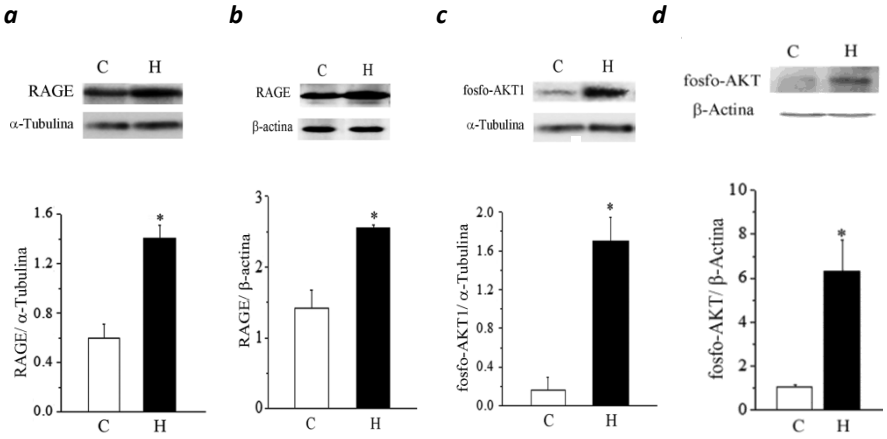


Fig. 4 Analiza receptorului RAGE Identificarea nivelului de AKT1 fosforilat. *(a)* Evidentierea receptorului RAGE in tesutul cardiac si *(b)* pulmonar. *(c)* Detectia AKT-1 fosforilat in inima si *(d)* palman. Pentru normalizarea rezultatelor s-au folosit α Tubulina si β-Actina. Datele sunt prezentate ca medie ± SD; p* < 0,05 vs. C.

7 – Administrarea fluvastatinei animalelor care au primit initial o dieta hiperlipidemica a avut un efect pozitiv la nivelul tesutului cardiac prin aducerea moleculului HMGB1 la un nivel genic si proteic asemanator cu cel detectat la animalele control.

La hamsterii hiperlipidemici tratati cu fluvastatina sodica (Ht) s-a detectat ca expresia genei Hmgb1, scade de 1,89 ori fata de hamsterii hiperlipidemici (Fig. 5*a*), iar nivelul proteinei HMGB1 in fractia citosolica este de 2,18 ori mai mic la animalele Ht comparativ cu cele din grupul H (Fig. 5*b*). Prin analiza densitometrica a benzilor proteice obtinute s-a demonstrat ca la hamsterii hiperlipidemici tratati, nivelul moleculei HMGB1 a scazut, in fractia nucleara, de 2,16 ori fata de grupul hamsterii hiperlipidemici (Fig. 5*c*).

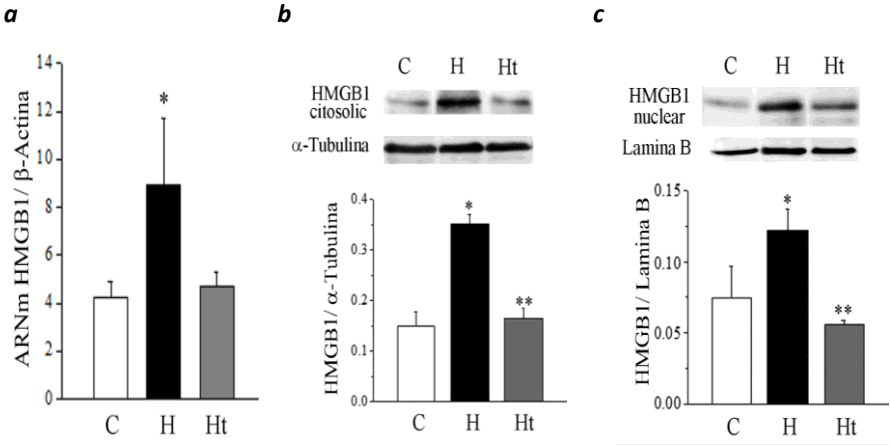


Fig. 5 Efectul produs de fluvastatina sodica asupra proteinei HMGB1 in inima. *(a)* Nivelul ARNm al HMGB1. *(b)* Imunodetectia alarminei HMGB1 in fractia imbogatita in proteine citosolice si *(c)* nucleare Pentru normalizarea rezultatelor s-au folosit β-Actina, α Tubulina si respectiv lamina B. Datele sunt prezentate ca medie ± SD; p* < 0,05 vs. C, p** < 001 vs H.

8 – Tratamentul cu fluvastatina a avut acelasi efect pozitiv asupra receptorului RAGE si a kinazei AKT1 fosforilate. Astfel, consecinta majora a acestor evenimente moleculare generate de actiunea fluvastatinei este reprezentata de diminuarea sintezei de novo a moleculelor pro-inflamatoare, inclusiv RAGE si HMGB1, avand consecinta reducerea inflamatiei tisulare.

Studiul in care s-a urmarit efectul hiperlipidemiei asupra caii de semnalizare initiata de HMGB1, a aratat ca la hamsterii hiperlipidemici expresia receptorului RAGE scadede 2,3 ori in grupul Ht in comparatie cu grupul H (Fig. 6*a*). De asemenea, rezultatele obtinute au indicat ca intre cele trei grupe de animale luate in studiu nu au existat modificari semnificative in nivelul de AKT1 in tesutul cardiac (Fig. 6*b*). Totusi, fluvastatina sodica a redus fosforilarea kinazei de 7,7 ori in grupul Ht fata de grupul H (Fig. 6*c*)

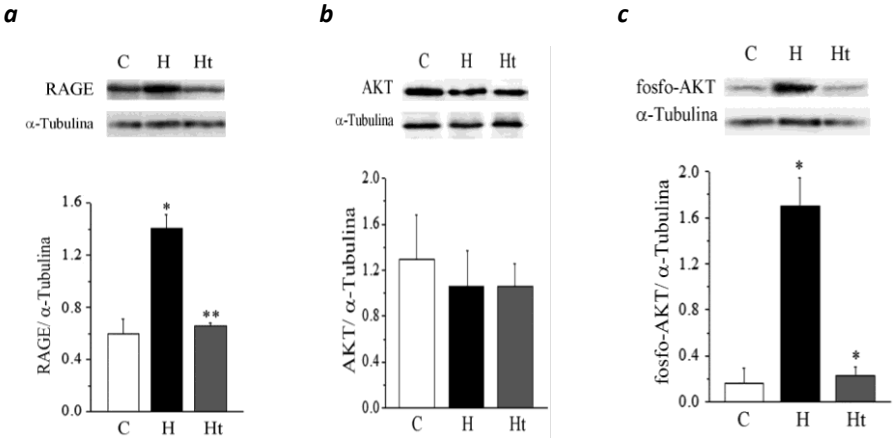


Fig. 6 Efectul pozitiv al tratamentului cu fluvastatina asupra moleculelor *(a)* RAGE, *(b)* AKT1 si *(c)* foso-AKT1 in tesutul cardiac. Datele sunt prezentate ca medie ± SD; p* < 0,05 vs. C, p** <0.01 vs. H.

9 – Un alt element de noutate demonstrat, il constituie capacitatea fluvastatinei de a reduce semnificativ concentratia serica a alarminei HMGB1.

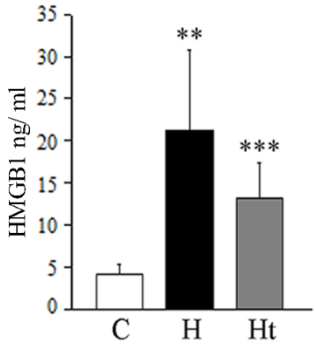


Fig. 7 Nivelul de HMGB1 seric detectat prin tehnica ELISA captura. Fiecare proba a fost masurata in triplicat. Datele sunt prezentate ca medie ± SD; p** < 0,01 vs. C, p*** <0.001 vs. C.

10 – La animalele tratate s-a inregistrat scaderea expresiei genice si proteice a HMGB1, in tesutul pulmonar. De asemenea, nivelul receptorului RAGE si gradul de fosforilare a kinazei AKT au fost in mod semnificativ reduse, fiind astfel afectata interactiunia HMGB1-RAGE si implicit semnalizare prin PI3K/ AKT, care activeaza factorul de transcriere NF-kB. Astfel, nivelul citokinelor pro-

inflamatorii va scadea, iar odata cu ele si procesul inflamator isi va pierde din intensitate.

Efectul medicamentului a fost observat si in plaman, unde expresia genica a proteinei HMGB1 a scazut de 1,46 ori la animalele tratate comparativ cu cea a grupului de animale hiperlipidemice, iar experimentele de imunnodetectie au confirmat scaderea expresiei proteice a HMGB1 de 1,2 ori in fractia citosolica (Fig. 45*a*) si de 1,27 (Fig. 45*b*) in fractia nucleara a hamsterilor tratati comparativ cu cei din grupul hiperlipidemic.

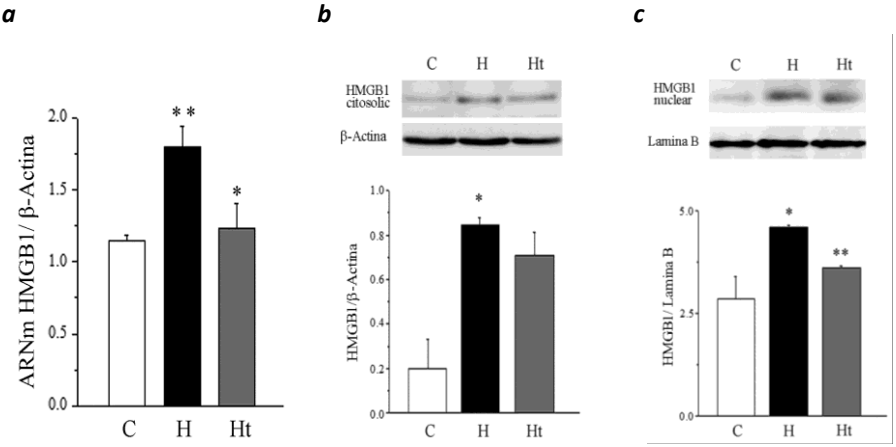


Fig. 8 Expresia genica *(a)* si proteica a moleculei HMGB1 in fractiile imbogatite in proteine citosolice *(b)* si nucleare *(c)* obtinute din tesutul pulmonar. Datele sunt prezentate ca medie ± SD; p** < 0,01 vs. C, p* <0.05 vs. H, corespunzatoare graficului (*a)*; p* < 0,05 vs. C, p** < 0,01 vs H, corespunzatoarea graficelor *(b)* si *(c)*.

Medicamentul administrat hamsterilor din grupul Ht a reusit sa scada de 2,6 ori efectul hiperlipidemiei asupra receptorului, asa cum se poate observa in Fig. 9*a*. In timp ce nivelul kinazei AKT1 a ramas aproape neschimbat la cele trei grupe de animale studiate (Fig. 9*b*), fosforilarea notabila a AKT1 la Thr^{308} observata in tesutul pulmonar al hamsterilor care au primit dieta hiperlipidemica a fost si de aceasta data redusa de 1,75 ori la hamsterii, carora li s-a administrat prin gavaj tratamentul cu fluvastatina sodica (Fig. 9*c*).

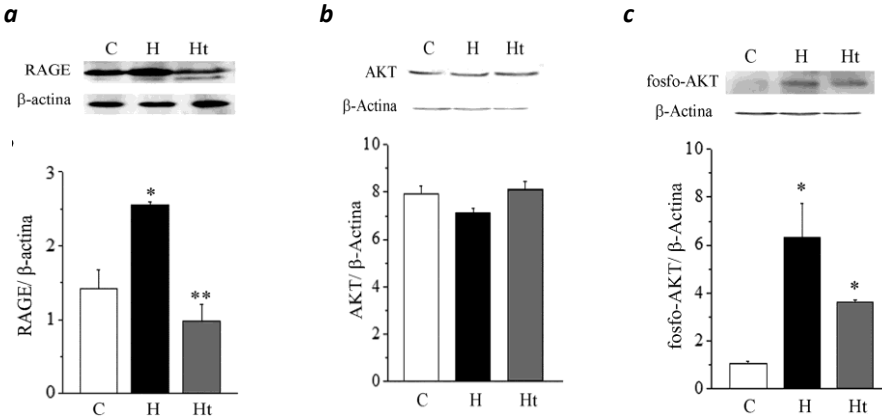


Fig. 9 Efectul pozitiv al tratamentului cu fluvastatina asupra moleculelor *(a)* RAGE, *(b)* AKT1 si *(c)* foso-AKT1 in plaman. Datele sunt prezentate ca medie ± SD; p* < 0,05 vs. C p** <0.01 vs. H, graficului (*a*); p* < 0,05 vs. C, corespunzatoarea graficelor *(b)* si *(c)*.

11 – Experimentele prezentate aduc noi dovezi care sustin ipoteza ca alarmina HMGB1 functioneaza ca un mediator al inflamatiei sistemice generate in timpul stresului hiperlipidemic.

12 – Modelul experimental *in vitro* propus, se incadreaze in categoria modelelor folosite in studierea celulelor spumoase, populatie preponderenta in leziunile aterosclerotice.

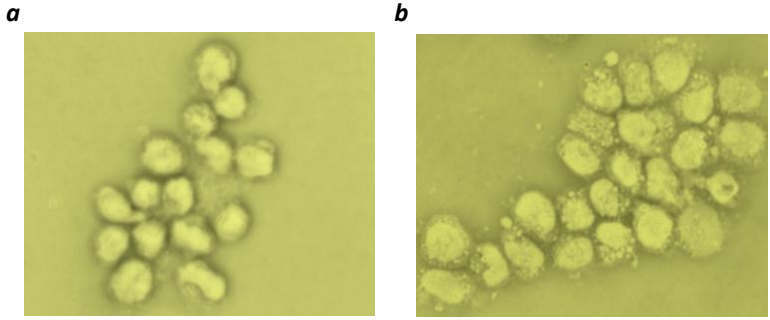


Fig. 10 Aspectul macrofagelor in cultura dupa 48h. *(a)* Celule control; *(b)* Celule activate cu ser hiperlipidemic. Imagini realizate in contrast de faza cu obiectivul 40x.

13 – Serul hiperlipidemic induce translocarea alarminei HMGB1 din nucleu in citoplasma, proces demonstrat prin cantitatea semnificativ redusa de HMGB1 in nucleu, dar crescuta in citosolul macrofagelor, pentru ca in final HMGB1 sa fie secretata in mediul extracelular.

Analiza densitometirca a benzilor proteice detectate cu anticorpi specifici a aratat ca in cazul celulelor activate (A), nivelul citosolic al moleculei HMGB1 a fost de 1,5 ori mai mare decat la celulele control (C), dar nivelul nuclear al proteinei a fost de 7 ori mai mic la celulele A comparativ cu celulele C, demonstrandu-se astfel ca serul hiperlipidemic folosit in activarea monocitelor U937 este capabil sa produca relocalizarea proteinei HMGB1 din nucleu in citosulul macrofagelor incarcate cu lipide.

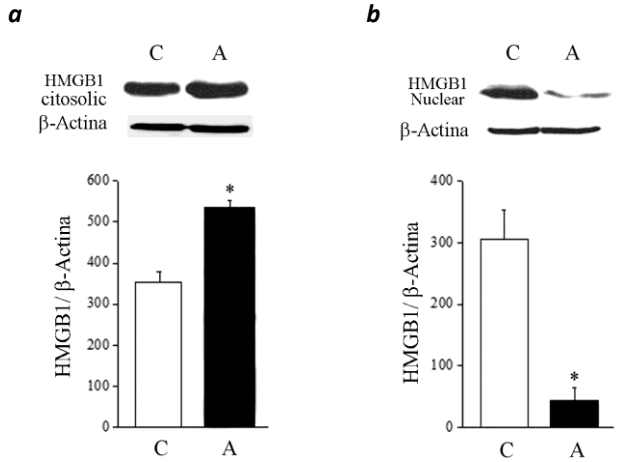


Fig. 11 Localizarea proteinei HMGB1 in fractia imbogatita in proteine citosolice *(a)* si nucleare *(b)* izolate din celulele control si activate cu ser hiperlipidemic. Datele sunt prezentate ca medie ± SD; p* < 0,05 vs. C.

14 – Rezultatele obtinute fac posibila introducerea proteinei HMGB1 pe lista citokinelor implicate in patogenia aterosclerozei, avand in vedere relocalizarea sa subcelulara in macrofagele incarcate cu lipide, ceea ce indica existenta unui rol important al alarminei HMGB1 inca din etapele timpurii ale procesului aterosclerotic.

15 – Macrofagele activate cu ser hiperlipidemic exprima pe suprafata lor receptorul RAGE intr-o cantitate mai mare decat celulele control. In acelasi context hiperlipidemic, a fost evidentiata activarea caii de semnalizare PI3K/AKT la macrofagele activate, prin fosforilarea kinazei AKT la treonina din pozitia 308.

Analiza densitometrica a benzilor proteice obtinute a aratat ca serul hiperlipidemic actioneaza asupra exprimarii proteinelor implicate in cascada de semnalizare HMGB1-RAGE via AKT.

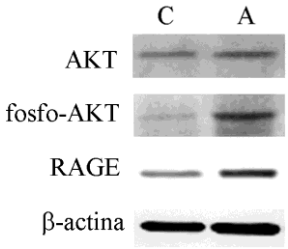
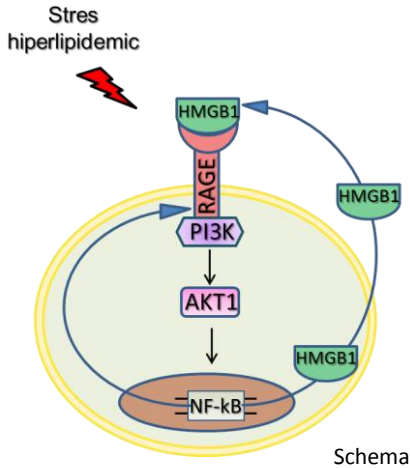


Fig. 12 Evidentierea prin *Western blot* a proteinelor AKT1, fosfo-AKT1, RAGE si β-actina in celule U 937 control si activate cu ser hiperlipidemic.

16 – Rezultatele studiului *in vitro* reprezinta o dovada clara ca HMGB1 este un mediator important al inflamatiei declansate de stresul hiperlipidemic, iar blocare ei ar putea reprezenta o cale fezabila de a incetini procesul aterogenic.



Schema personala

Fig. 13 HMGB1 mediator al procesului inflamator initiat de stresul hiperlipidemic

In urma corelarii acestor date cu cele obtinute anterior, consideram ca alarmina HMGB1 este secretata de macrofagele incarcate cu lipide, iar dispunerea ei in mediul extracelular ii va permite interactiunea cu receptorul RAGE, exprimat pe suprafata acestor celule. Astfel, HMGB1 intretine procesul inflamator declansat de stresul hiperlipidemic.

17 – Animalele dublu transgenice (dTg) au suferit pe parcursul a opt saptamani diferite dezechilibre metabolice si somatice care au condus la instalarea diabetului zaharat de tip 1, reprezentand o alegere conforma cu cerintele experimentelor.

18 – Modificarile biochimice produse la animale dTg, reprezentate mai ales de nivelul glicemic ridicat, a generat acestor animalele o stare lipisita de energie, explicata prin lipsa insulinei care asigura necesarul energetic celular. Aceasta stare a dus implicit la scaderea in greutate a animalelor diabetice.

Tabel 1

Caracteristicile animalelor control si diabetice

Grupa de animale	sTg	dTg
Greutate corp (g)	25 ± 0.5	16 ± 0.5
Glucoza (mg/dl)	110± 1.5	430 ± 2.5

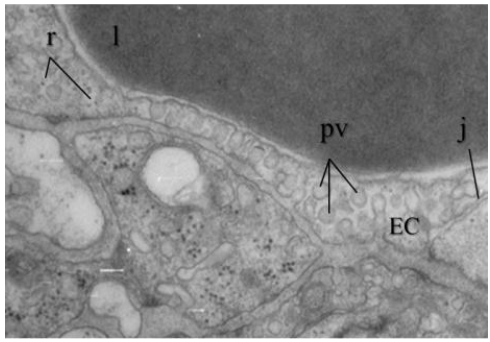
Datele sunt prezentate ca medie ± SEM.

19 – Morfologia atipica a endoteliului vascular pulmonar detectata la soarecii dTg si nivelul ridicat al proteinei HMGB1 in plamanul diabetic, fapt explicat prin rata mare de sinteza a HMGB1 si prin translocarea ei din nucleu in citosol, indica existenta procesului inflamator la nivelul acestui tesut.

La soarecii dTg, microscopia electronica a permis detectia unor modificari structurale evidente la nivelul celulelor endoteliale din capilarele pulmonare. Astfel, endoteliul a afisat un aparat sintetic bine dezvoltat reprezentat de reticulum endoplasmatic si numerosi ribozomi indicand o intensa activitate secretorie. In plus, la soarecii dublu transgenici, numarul caveolelor endoteliale a fost mai ridicat decat la soarecii din grupul control. De asemenea, lamina bazala a

fost considerabil ingrosata la soarecii dTg, comparativ cu cea a soarecilor sTg (Fig. 14).

a



b

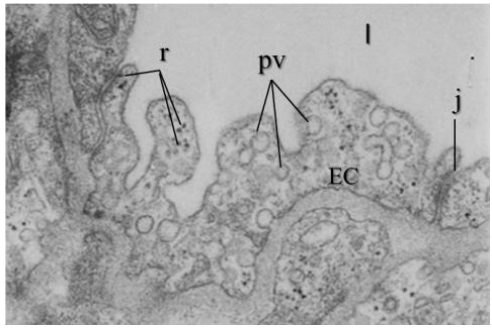


Fig. 14 Microscopia electronica a endoteliului vascular pulmonar la animalele sTg folosite control *(a)* si dTg *(b)* ; r: ribozomi, l:lumen, pv: vezicule plasmalemale, j: jonctiune. Bara = 200 nm

Evaluarea proteinei HMGB1 in tesutul pulmonar al soarecilor sTg si dTg, s-a realizat atat prin tehnica de real time PCR cat si Western blot, pentru a putea stabili si evidentia cu certitudine existenta eventualelor modificari din expresia genica, respectiv proteica a moleculei. Astfel, la soarecii diabetici s-a detectat ca expresia genei Hmgb1, creste de 1,75 ori fata de soarecii control (Fig . 15*a*), nivelul alarminei HMGB1 in fractia imbogatita in proteine citosolice creste semnificativ,

acesta fiind de 3,14 ori mai mare comparativ cu animalele din grupul C (Fig. 15*b*), iar in
fractia imbogatita in proteine nucleare creste de 3,94 ori comparativ cu animalele din grupul control (Fig. 15*c*).

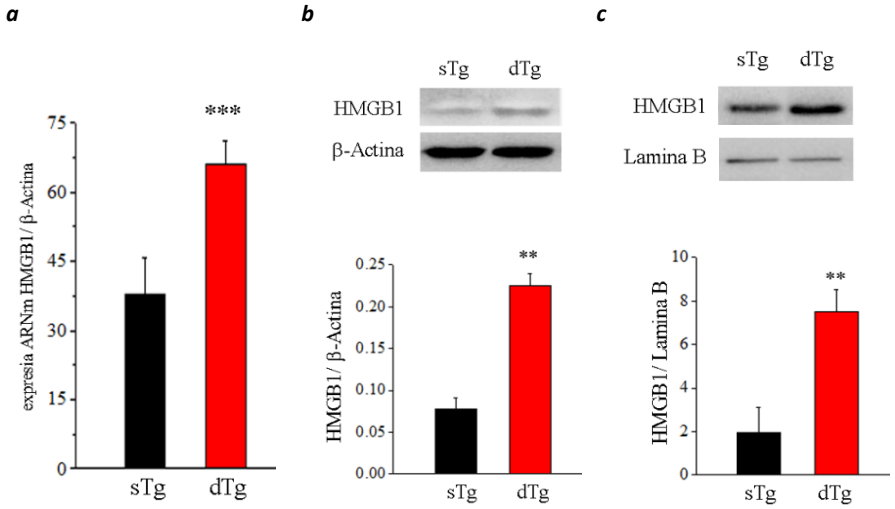


Fig. 15 Expresia genica *(a)* si proteica a moleculei HMGB1 in fractiile imbogatite in proteine citosolice *(b)* si nucleare *(c)* obtinute din tesutul pulmonar al soarecilor sTg si dTg. Datele sunt prezentate ca medie ± SD; p** < 0,01 vs. sTg, p*** < 0,001 vs. sTg.

20 – Procesul inflamator pus in evidenta in plamanul diabetic, este mentinut si ulterior amplificat prin caile de semnalizare activate de alarmina HMGB1. Astfel, nu a fost semnalt doar nivelul ridicat al receptorului RAGE in tesutul pulmonar al soarecilor diabetici, ci si activarea lui, evidentiata prin fosforilarea kinazei AKT1 si prin nivelul ridicat al subunitatii p65 a factorului de transcriere NF-kB. Deoarece, factorul nuclear kB este implicat in sinteza de novo atat a receptorului RAGE cat si a alrminei HMGB1, consideram ca in plamanul diabetic este indusa o stare inflamatorie care poate capata amploarea necesara pentru producerea modificarilor histologice tisulare si a afectarii functiei pulmoare.

Experimentele au demonstrat ca in plamanul diabetic nivelul receptorului creste semnificativ, acesta fiind de 3,58 ori mai mare comparativ cu nivelul detectat la soarecii control (Fig. 16*a*). Nivelul de fosfo-AKT din tesutul pulmonar a crescut de 2,56 ori la grupul dTg

comparativ cu grupul sTg (Fig. 16*b*), iar expresia proteica a NF-kB p65 creste semnificativ la soarecii dTg, avand un nivelul de 7,2 ori mai mare decat la soarecii sTg.

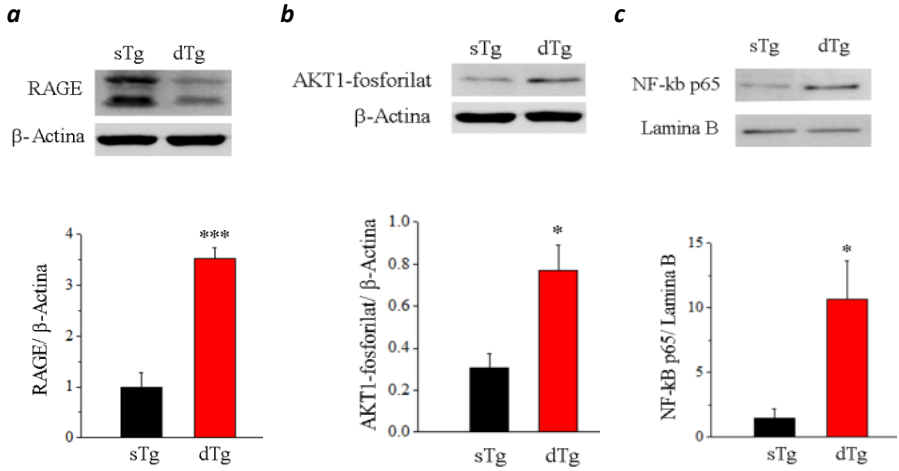


Fig. 16 Imunodetectia receptorului RAGE *(a)*, foso-AKT1 *(b)* si a factorului de transcriere NF-kB subunitatea p65 *(c)* in tesutul pulmonar. Datele sunt prezentate ca medie ± SD; p* < 0,05 vs. sTg, p*** < 0,001 vs. sTg.

In concluzie, rezultatele obtinute au demonstrat ca procesul inflamator pus in evidenta in plamanul diabetic, este mentinut si ulterior amplificat prin caile de semnalizare activate de alarmina HMGB1.

21 – In lumina acestor date si a implicatiilor lor, eventule terapii tintite care sa urmareasca blocarea alarminei HMGB1 ar putea fi esentiale pentru diminuarea complicatiilor cardio-respiratorii asociate hiperlipidemiei si diabetului.

Lucrarii publicate in reviste internationale cotate ISI

1. Elena Uyy, Felicia Antohe, Luminita Ivan, **Raluca Haraba**, Dorel Lucian Radu, Maya Simionescu, *Upregulation of caveolina-1 expression is associated with structural modifications of endothelial cells in diabetic lung*, Microvasc Res. 2010; 79(2):154-9. (FI 3.075)

2. **Raluca Haraba**, Elena Uyy, Viorel I. Suica, Luminita Ivan, Felicia Antohe - *Fluvastatin reduces the high mobility group box 1 protein expression in hyperlipidemia, International Journal of Cardiology*, Int J Cardiol. 2011 1;150(1):105-7. (FI 7.078)

3. **Raluca Haraba**, Viorel I. Suica, Elena Uyy, Luminita Ivan, Felicia Antohe, *Hyperlipidemia stimulates the extracellular release of nuclear high mobility group box 1 protein*, Cell Tissue Res. 2011;346(3):361-8 (FI 3,114)

4. **Raluca Haraba**, F Antohe - *T cells are active participants in the progression of atherosclerotic plaques*, DJNB 2011; 6;4: 1529-1534 (FI 2,079)

5. Elena Uyy, Luminita Ivan, **Raluca Boteanu**, Viorel Suica and Felicia Antohe, *Heat shock proteins and membrane caveolins overexpression in experimental hyperlipidemia*, Trimisa spre publicare la Biology of the Cell, 2012 (FI 4,898)

***Lucrari prezentate la conferinte internationale* – 32**

Lucrari prezentate la conferinte nationale – 13

Specializari si cursuri efectuate – 5

Premii obtinute – 3

Participarea la proiecte de cercetare – 9

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” si **UNITATEA EXECUTIVA PT FINANTAREA INVATAMANTULUI SUPERIOR, A CERCETARII DEZVOLTARII SI INOVARII**

PN-III-P1-1.1-TE-2019-2044 (acronim A2A)
„Peptide derivate din apolipoproteina A-II cu potential terapeutic in ateroscleroza”

RAPORT ȘTIINȚIFIC
privind implementarea proiectului in perioada 01/01/2021 - 31/12/2021

In cadrul proiectului de cercetare **PN-III-P1-1.1-TE-2019-2044 (acronim A2A)** cu titlul: „Peptide derivate din apolipoproteina A-II cu potential terapeutic in ateroscleroza” au fost realizate următoarele activități planificate in cadrul Etapei 2:

Etapa 2 - Generarea de adenovirusuri recombinante care codifică peptide derivate apoA-II cu cisteină (SSCH1, SSCH2, SSCH3, SSCH1H2, SSCH2H3), precum și apoA-II cu lungime completă.

Activitatea 2.1 - Generarea de adenovirusuri recombinante care codifică peptide derivate apoA-II cu cisteină precum și apoA-II cu lungime completă,

Activitatea 2.2 - Amplificarea adenovirusurilor recombinante care codifică peptide derivate apoA-II cu cisteină precum și apoA-II cu lungime completă,

Activitatea 2.3 - Purificarea adenovirusurilor care codifică peptidele derivate din apoA-II,

Activitatea 2.4 - Titrarea adenovirusurilor care codifică peptidele derivate din apoA-II.

Activitatea 2.1 - Generarea de adenovirusuri recombinante care codifică peptide derivate apoA-II cu cisteină precum și apoA-II cu lungime completă:

In cadrul acestei activitati au fost obținute adenovirusuri care codifica peptide derivate din apoA-II (SSCH1, SSCH2, SSCH3, SSCH1H2, SSCH2H3), precum și apoA-II cu lungime completă. După confirmarea prin digestie enzimatică, din fiecare clona pozitiva selectata s-a realizat amplificarea ADN in bacterii DH5α si s-a obtinut o cantitate mare de ADN (folosind kitul Midiprep de la Qiagen).

Activitatea 2.2 - Amplificarea adenovirusurilor recombinante care codifică peptide derivate din apoA-II cu cisteină precum și apoA-II cu lungime completă:

Celulele AD293 au fost insamantate in flaskuri T25 si transfectate cu ADN recombinant linearizat cu enzima de restricție *PacI*. Dupa 12 zile, mediul cu celule transduse a fost colectat si centrifugat. Sedimentul celular a fost resuspendat in PBS si supus unor cicluri de inghetare (in azot lichid) - dezghetare (la 37°C) succesiv de trei ori, apoi a fost trecut prin seringa (23G). Atat mediile colectate cat si sedimentele obtinute au fost adaugate peste celule AD293 (insamantate cu o zi inainte). Adenovirusurile au fost amplificate succesiv in flask-uri T75 → T175 → 5 flaskuri T175 → ≥ 25 flaskuri T175. Intrucat vectorul adenoviral utilizat in obtinerea adenovirusurilor (care codifica pentru proteina ApoA-II) produce si proteina fluorescenta verde (GFP, Green Fluorescence Protein), celulele care au produs adenovirusul au putut fi monitorizate si prin microscopie de fluorescenta.

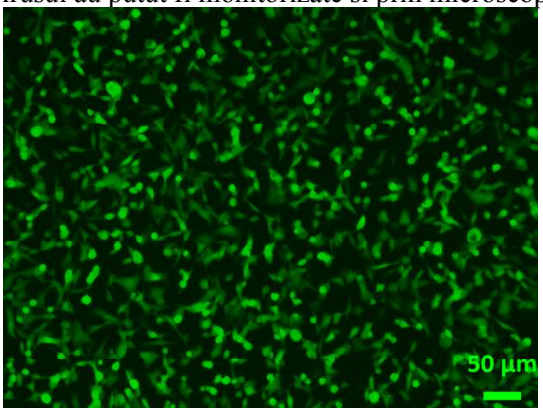


Fig 1. Imaginea celulelor AD293 transduse cu adenovirus ApoA-II (la microscopul de fluorescenta).

Activitatea 2.3 - Purificarea adenovirusurilor care codifică peptidele derivate din apoA-II:

Mediul continand celule transfectate cu adenovirus au fost colectate si centrifugate. Adenovirusurile din mediu au fost precipitate utilizand sulfat de amoniu, apoi a fost realizata purificarea adenovirusurilor prin ultracentrifugare in gradient de CsCl urmata de dializa. In paralel cu mediul, celulele care au produs adenovirusurile au fost colectate, centrifugare si supuse unor cicluri consecutive inghet/dezghet, apoi s-a efectuat purificarea adenovirusurilor prin ultracentrifugare in gradient de CsCl.

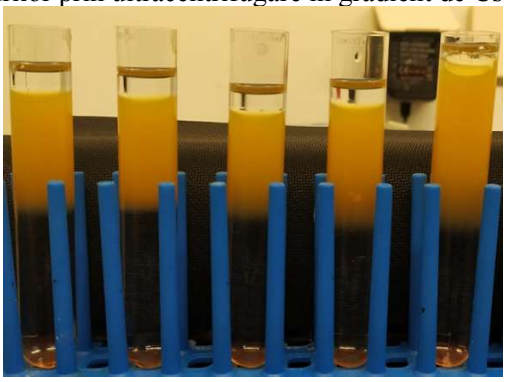


Fig 2. Incarcarea cu probe a coloanelor de ultracentrifuga in vederea purificarii adenovirusului ApoA-II prin ultracentrifugare in gradient de CsCl.

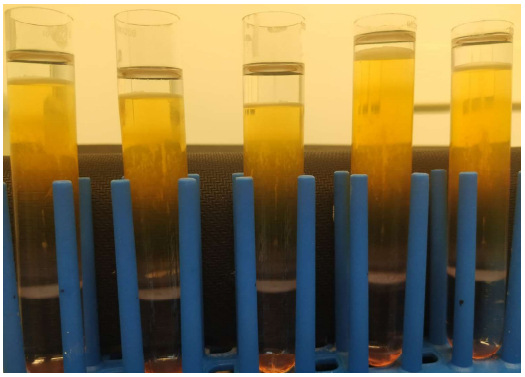


Fig 3. Purificarea adenovirusului ApoA-II prin ultracentrifugare in gradient de CsCl.

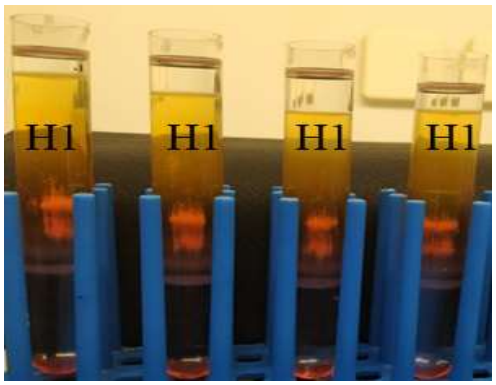


Fig 4. Purificarea fragmentului ApoA-II H1 prin ultracentrifugare in gradient de CsCl.

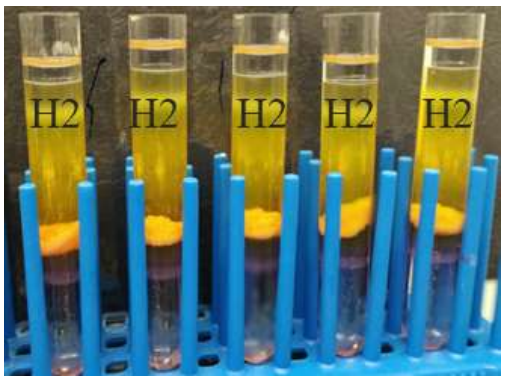


Fig 5. Purificarea fragmentului ApoA-II H2 prin ultracentrifugare in gradient de CsCl.

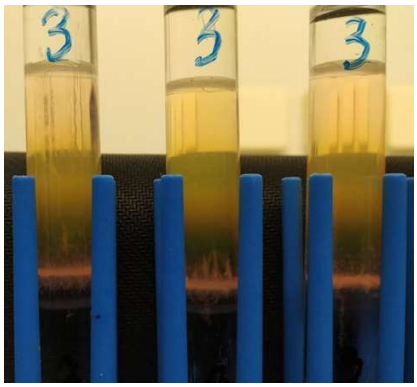


Fig 6. Purificarea prin ultracentrifugare in gradient de CsCl a fragmentului ApoA-II H3.

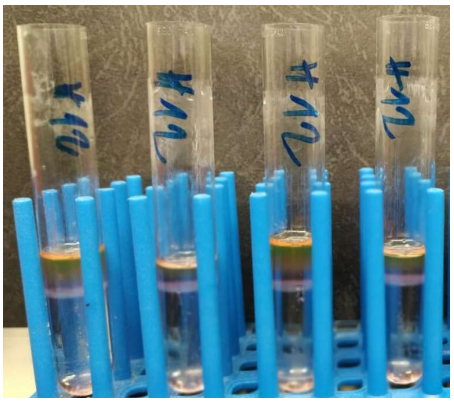


Fig 7. Purificarea fragmentului ApoA-II H1H2 prin ultracentrifugare in gradient de CsCl.

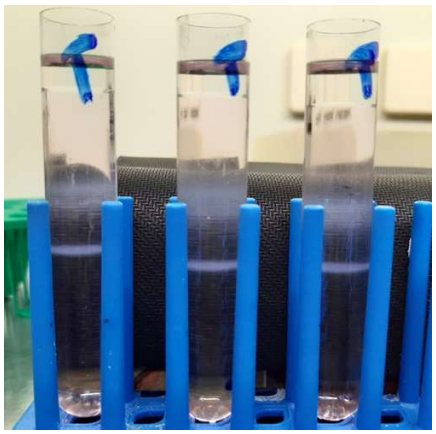


Fig 8. Purificarea ApoA-II total prin ultracentrifugare in gradient de CsCl.

Activitatea 2.4 - Titrarea adenovirusurilor care codifică peptidele derivate apoA-II:

Titrarea adenovirusurilor care codifică peptidele derivate din apoA-II a fost realizata prin citometrie in flux, in urma transducerii celulelor AD293 cu adenovirus purificat. Au fost realizate dilutii seriale ale stocului viral (10^{-3}-10^{-7}) si au fost evaluate celulele GFP pozitive prin citometrie in flux.

Titrul adenoviral obtinut a fost cuprins intre 1.7- 4.3x10^{11} TU/ml (TU=Transforming Units).

Titrul viral a fost calculat utilizand urmatoarea formula:

TU/ml=D*F/100*C/V

D=factor de dilutie
F=numarul de celule pozitive/100
C=numarul de celule/godeu
V=volumul de inocul

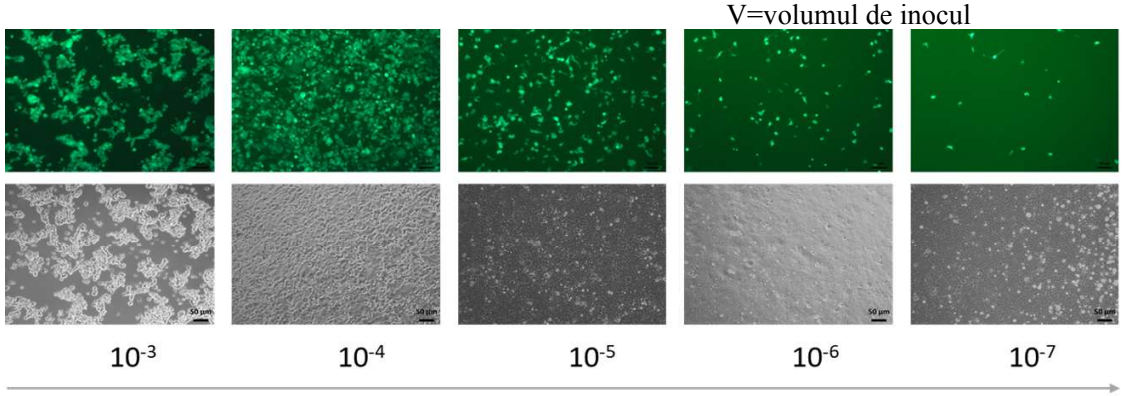


Fig 9. Titrarea adenovirusului apoA-II: celulele AD293 au fost transduse cu adenovirus folosind diferite dilutii seriale ale stocului viral (10^{-3}-10^{-7}).

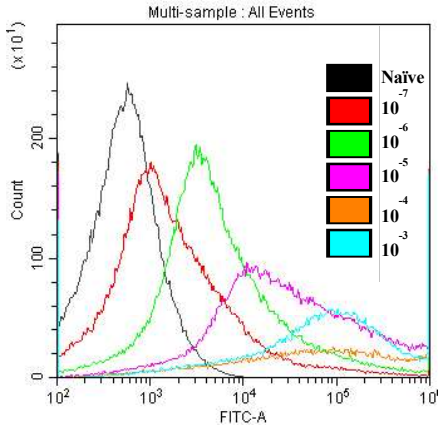


Fig 10. Titrarea adenovirusului apoA-II: celulele au fost transduse cu adenovirus folosind diferite dilutii seriale ale stocului (10^{-3}-10^{-7}), iar dupa 48 de ore de la transducere celulele GFP pozitive au fost evaluate prin citometrie in flux.

Titrul viral al adenovirusurilor care codifică peptide derivate apoA-II cu cisteină (SSCH1, SSCH2, SSCH3, SSCH1H2), precum și apoA-II cu lungime completă a fost cuprins intre **1.7-4,3x10^{11} TU/ml**.

Diseminarea rezultatelor: Rezultatele obținute in cadrul proiectului au fost prezentate sub forma de postere si prezentari orale la următoarele manifestări științifice:

- "**Generation of recombinant adenoviruses encoding ApoA-II**", Gabriela Florea, Irina F. Tudorache, Violeta G. Trusca, Anca V. Gafencu, poster prezentat la „A 23 a Conferinta Internationala: Materials, Methods & Technologies", organizata in Burgas, Bulgaria in perioada 19-22 August 2021.
- "**An optimised method to obtain recombinant adenoviruses**", prezentare orala sustinuta de catre Violeta Trusca la „A 23 a Conferinta Internationala: Materials, Methods & Technologies", organizata in Burgas, Bulgaria in perioada 19-22 August 2021.
- **„Generation of recombinant adenoviruses encoding ApoA-II**", autori Gabriela Florea, Irina F. Tudorache, Violeta G. Trusca, Laura Moise, Madalina Fenyo, Anca V. Gafencu, poster prezentat la simpozionul aniversar „International Conference under the aegis of the Romanian Academy - The 42nd Anniversary Symposium of The Institute of Cellular Biology And Pathology "Nicolae Simionescu" held jointly with The 38th Annual Scientific Session of The Romanian Society For Cell Biology - "From basic cell biology to personalized medicine during Covid-19 pandemic; creativity and vision in a rapidly changing world", 4-6 Noiembrie, 2021.
- **„Understanding apolipoprotein gene regulation, a key step toward the development of successful therapies for reduction of atherosclerosis",** prezentare orala sustinuta de catre Violeta Trusca la simpozionul aniversar „International Conference under the aegis of the Romanian Academy - The 42nd Anniversary Symposium of The Institute of Cellular Biology And Pathology "Nicolae Simionescu" held jointly with The 38th Annual Scientific Session of The Romanian Society For Cell Biology - "From basic cell biology to personalized medicine during Covid-19 pandemic; creativity and vision in a rapidly changing world", 4-6 Noiembrie, 2021.

Publicații: „***Apolipoprotein A-II - role in health, cardiovascular disease, diabetes, cancer, and other pathologies***", autori Gabriela Florea, Irina Florina Tudorache, Madalina Dumitrescu, Ioana Madalina Fenyo, Violeta Georgeta Bivol (Trusca), Anca Violeta Gafencu, manuscris in preparare. „***The Promise of Apolipoprotein AI-Based Therapy***", Trusca VG, Austin Journal of Molecular and Cellular Biology.

In concluzie, obiectivul etapei 2 al proiectului PN-III-P1-1.1-TE-2019-2044 (A2A): „Generarea de adenovirusuri recombinante care codifică peptide derivate din apoA-II, precum și apoA-II cu lungime completă" a fost îndeplinit in totalitate.

PROGRESS REPORT – 2nd year

Runtime of the project:
x☐ 2nd year

Period covered:
From 12 /06/2018 to 12/05/2019

Acronym	XploreCAD
Project Title	Advanced ex vivo analyses and multi-frequency ultrasound technology for improved evaluation and diagnosis of coronary plaque
Start Date Consortium	December 19th, 2017
Date of the Report	March 2019

PARTNERS

Number	Principal Investigator	Organisation	Country
1 (Coordinator)	Rune HANSEN	Stiftelsen SINTEF, Trondheim	Noeway
2	Felicia ANTOHE	Institute of Cellular Biology and Pathology N. Simionescu, Bucharest	Romania
3	Mathieu LEGROS	Vermon, SA, Tours	France
4 (Associated partner)	Kenneth Caidahl	Karolinska University Hospital	Sweden

1. Achievement of planned objectives

Describe the activities that have been performed during the year to meet the objectives given in the proposal. Outline the work carried out by each partner. Explain the progress of the work in line with the work plan (including milestones and deliverables). Estimate the current degree of completion of the objectives (Max. 2 pages).

The activities performed in this period were fully complete according to the Gantt diagram. The M1.1a was completed and the M1.2a was started with bioinformatics analysis and validation of the results generated by mass spectrometry analysis. Simultaneously selection and significance of the data will be performed to finish the proposed milestones and to build the reports for M1.2a; M1.1b; M2.1 in due time (end of 2020).

***In vivo* experimental design and preliminary results**

As mentioned in the first year report the experimental lot of 40 rabbits described in the project was split in two because of the limited logistical capacity of the subcontracted animal facility located at National Institute of Research and Development Cantacuzino (INCDMM), Contract No. A420, 23/04/2018. Thus the first lot of 20 rabbits (Stage I) was developed and completed between: August and November 2018. The next lot (Stage II) was developed between March and June 2019. At this time all the animals were processed and tissue samples and blood were harvested and deposited at low temperature to be analysed. The partial preliminary results of the Stage I (M1.1a) were reported on December 5th, 2018 to the UEFISCDI, the financial authority and could be found at the following web

site address: http://www.icbp.ro/static/en/en-networking_grants-grants-international/xplorecad.html.

The WP2 of the full proposal was focused on the evaluation of selected alarmins in plaques and sera of atherosclerotic patients. Up until this moment, patient enrollment and sample collection have been performed, as initially proposed, by KUH partner.

Related to the alternatives described in the WP2 tasks about the proteomic evaluation of plaques/serum from atherosclerotic patients, we all decided according to the suggestion of Ulf Hedin to skip the part related to proteomics on human plaques because this to a large extent already was done within their BIKE project.

Since part of the activities, concerning the mass spectrometric analyses have already been performed by KUH partner during another study, the ICBP partner remains with the on-going tasks of confronting and corroborating the results coming from the aortic, carotid and coronary plaque mass spectrometric analyses from the atherosclerotic rabbit model with the results obtained by the KUH partner from human carotid plaques. Qualitative and semi-quantitative data from the two types of samples will be compared using Protein Center LIMS bioinformatics platform for proper data management and relevant projection of alarmin biomarker pattern potential in order to propose selected molecules for microbubble targeting purposes and detection using the proposed ultrasound transducer.

By analyzing blood and plaque samples from both patients and animal models, the XploreCAD project will identify potential biomarkers of coronary artery disease. Using a new atherosclerotic animal model, the New Zeeland White Rabbits exposed to hyperlipidemia in the presence or absence of statins in association with PCSK9 inhibitors, we can safely assume that the high-performance technologies proposed will evidence modified profiles of pro- inflammatory cytokines, adhesion factors and regulatory proteins that can reduce atheroma plaques for the benefit of human health. In Figure 1 the general protocol followed to implement the project is shown as an interconnected diagram.

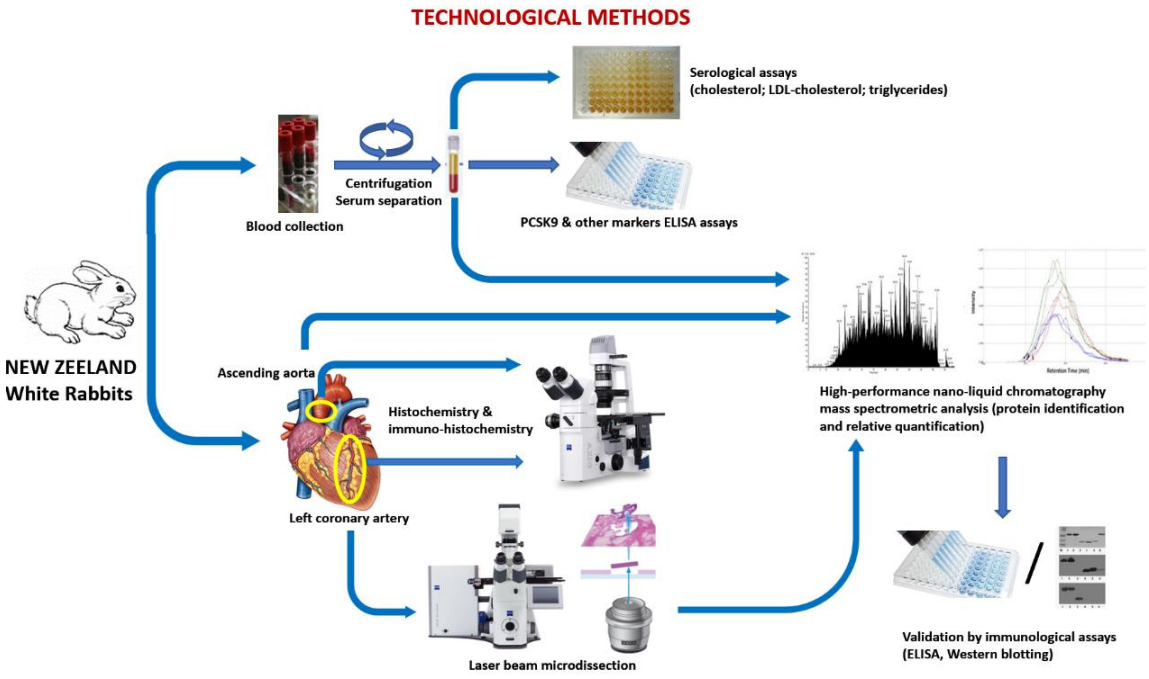


***Figure 1**. The novel design of the experimental model for atherosclerosis and the smart selection of clinical, biochemical and mass spectrometry tecnologies were carrefuly selected to unreveal the potenial biomarkers responsible for the residual risks in cardiovascular disease under agresive treatment with low lipid drugs.*

Progress / Intermediary results

After 12 weeks the tissue fragments harvested from all animal groups demonstrated that atherosclerotic advanced unstable plaques were developed in the lesion pron-areas of all animals fed high fat diet and the applied treatment reduced significantly the plaques dimension and also the histologycal aspects of the lesion.
Significant macroscopic modification could be observed when the animals were euthanized and the aorta, heart, carotid arteries tissue fragments were harvested from each animal. In Fig. 2, upper pannel, the general aspect of the liver can be visualised and is indicative of the effects of the hyperlipidemic diet. The lower pannel of Fig. 2 demonstrated severe lipid deposits in a representative Oil Red O coronary artery stained section, as opposed to the C and As animals.

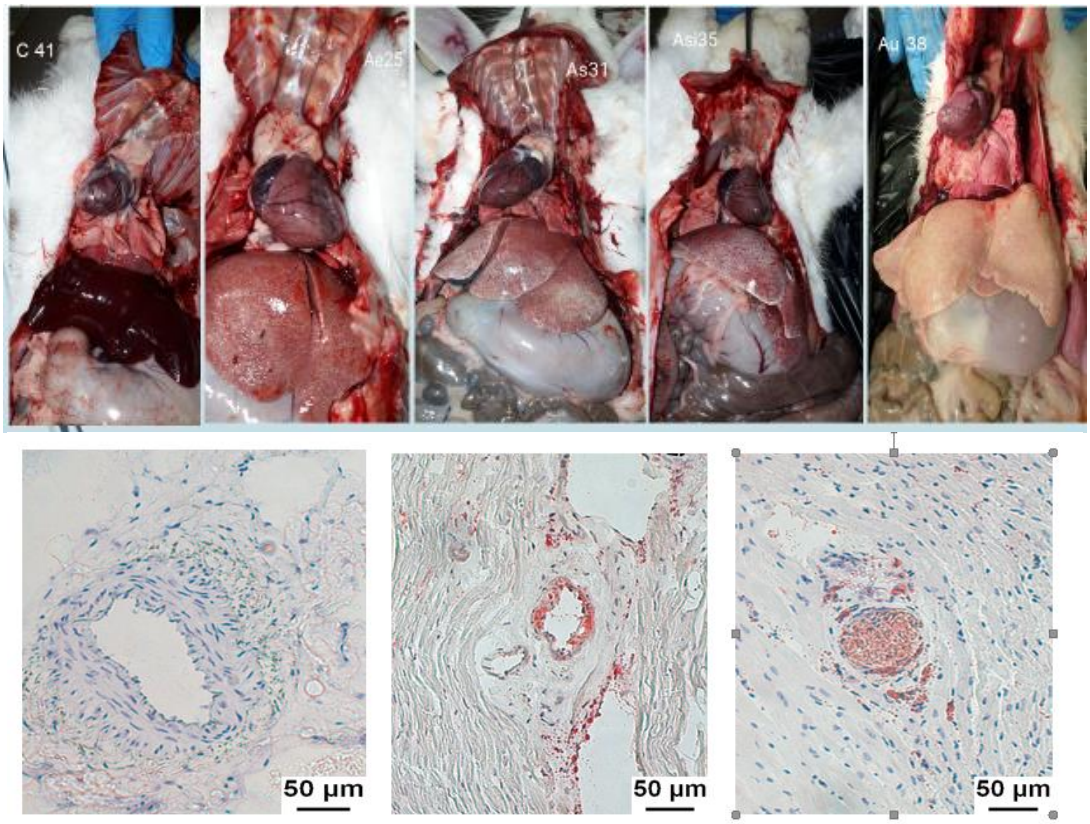


Figure 2 *.The macroscopic aspects of the internal organs of C, Ae, As, Asi and Au rabits (from left to right) at the end of the experiment (after 12 weeks) are presented in the upper pannel. Representative hematoxilin and lipid specific Oil Red O dye stainings of coronary artery frozen sections of C, As and Au (from left to right) animals are depicted in the lower pannel.*

One of the highlights of the XploreCAD project was the analysis of molecules or molecular patterns such as alarmins, to discriminate the different stages of atheroma plaque progression and better explain the residual risk of cardiovascular-related events and mortality after treatment with conventional and/or modern specific drugs. These molecules are a class of multifunctional endogenous proteins released under long-lasting stress factors, such as the hyperlipidemic diet.
In this regard, the ICBP partner has been responsible for the *in vivo* experimental design in order to assess and reveal specific patterns of alarmins and other molecules in early/ vulnerable plaques of hyperlipidemic animals when compared to appropriate controls. The proposed mass spectrometry-based proteomic analysis tackles both the local, tissue level of alarmins (and other significantly altered resident molecules) but also their circulating levels inside the blood flow.
The hyperlipidemic, as well as the animal groups which received treatments were evaluated at different time points for plasma lipid and glucose levels using specific assay kits from DIALAB GMBH (Wiener Neudorf, Austria) (Fig. 3).

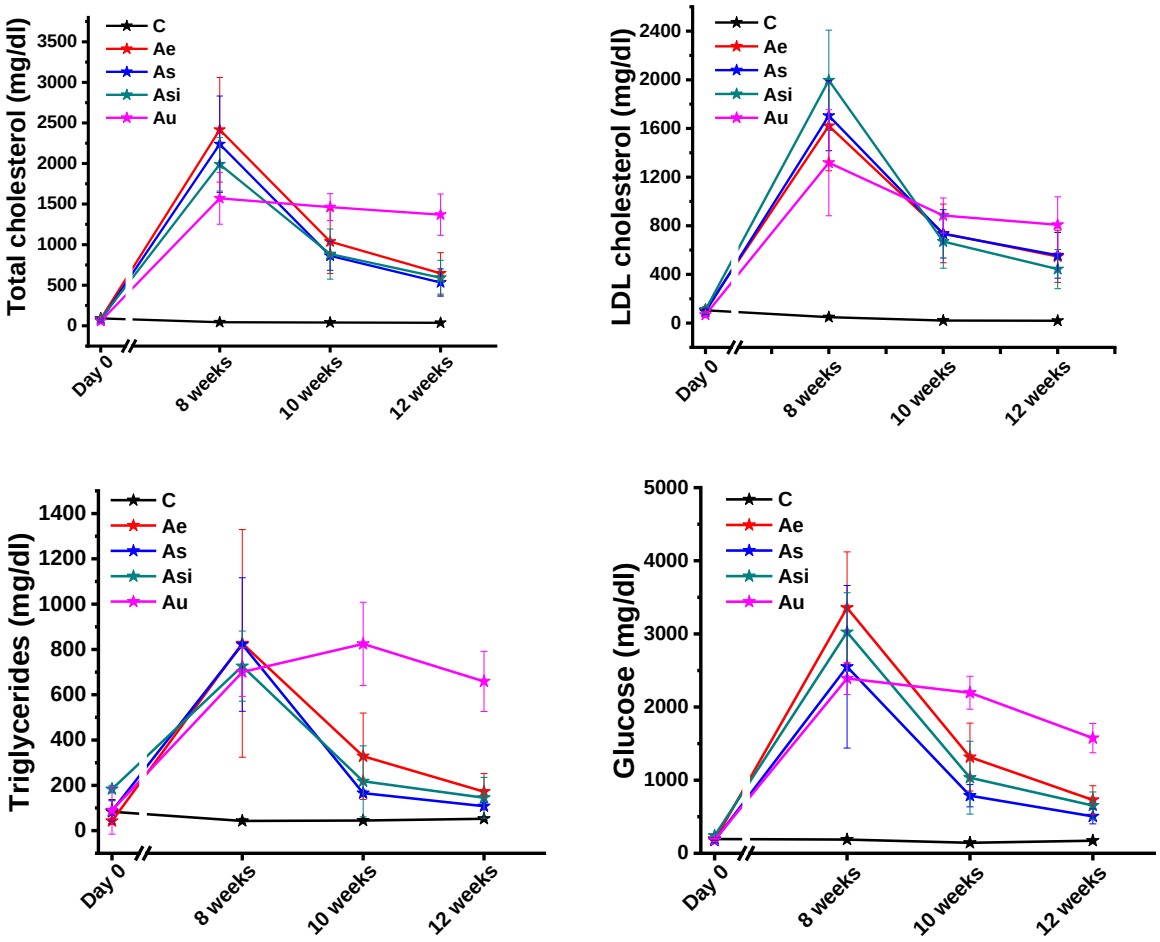


Figure 3: *Plasma quantitation of total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides and glucose levels for the 5 animal groups proposed in this study during the 12 weeks of animal experimentation: C- control group, Ae – early atherosclerotic group, As – statin and PCSK9 antibody stabilized atherosclerotic group, Asi – statin and PCSK9 siRNA stabilized atherosclerotic group and Au – vulnerable atherosclerotic group.*

Representative frozen sections of coronary arteries were laser- microdissected using the Zeiss PALM microbeam laser microdissection system (Oberkochen, Germany), to specifically isolate the coronary atheroma plaques (Fig. 4). The samples were suitably prepared for nano liquid chromatography – tandem mass spectrometric analysis using the Easy nLC II system coupled to the LTQ Orbitrap Velos Pro ETD hybrid mass spectrometer (Thermo Scientific, Illinois, USA), as previously mentioned (1). In parallel, tissue homogenates from carotid and ascending thoracic artery areas were performed to further corroborate the alarmin and other significantly altered protein levels along the lesion-prone area of the vascular tree. Sera samples harvested at the end of animal experimentation period were used for exosome isolation (using the miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit from Qiagen, Venlo, The Netherlands) and proteomic analysis.

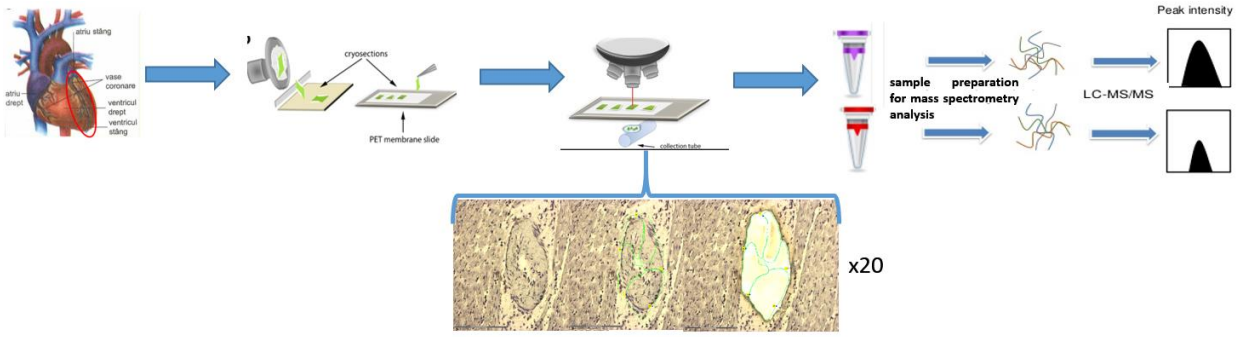


***Figure 4**: Coronary atheroma plaque laser microdissection workflow. Frozen coronary arteries, embedded in NEG-50 optimal cutting temperature medium were sectioned and stained with hematoxylin dye. The atherosclerotic lesions were laser-microdissected and the harvested material (~5mm^2) from each animal was solubilized and prepared for mass spectrometric analysis.*

The shotgun proteomic analysis (Proteome Discoverer 2.4, Thermo Scientific) revealed a plethora of alarmins and other molecules that were generally identified with high confidence in all animal groups proposed in this study.
The proteomic analysis of the microdissected atheroma plaque samples evidenced a total of 615 proteins, 77 of which were uniquely observed in the Ae group, 61 in the As group, 130 in the Asi group and 131 were only identified in the Au group. 41 proteins were common to all groups taken in this study (Fig. 5).

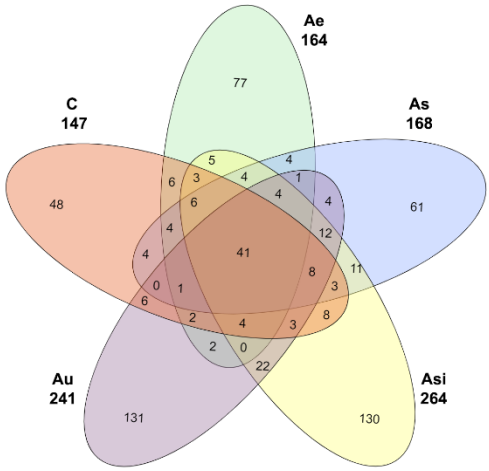


***Figure 5:** Venn intersection of the identified proteins from the laser microdissected atheroma plaques of the C, Ae, As, Asi, and Au animal groups.*

The alarmins identified in the experimental animal groups in all conditions and different areas of vascular bed are presented in Table 1. The recently performed protein inference will be closely followed by label-free relative mass spectrometric quantification and immunological validation. These studies will reveal which alarmins as well as the associated molecules will be differentially regulated by the hyperlipidemic diet and/or the anti-atherosclerotic treatment.

***Table 1**: Alarmins identified in the thoracic aorta, carotid, coronary artery samples and serum exozomes from all types of experimental animal groups (C, Ae, As, Asi, and Au) using mass spectrometric analysis. The experiment was performed in three technical replicates using three biological animals per group.*

The Sequest score is presented and reveals the confidence level of the identified proteins. A Sequest Score > 10 is generally accepted as the minimum confidence threshold of an inferred protein molecule.

No.	UniProt code	Protein description	Thoracic aorta	Carotid artery	Coronary artery	Serum exosomes
			Sequest score			
1	P51662	Annexin A1	7700.9	10244.48	-	-
2	P33477	Annexin A11	1544.57	1157.06	-	-
3	P15253	Calreticulin	4777.38	1282.5	-	-
4	O18750	Endoplasmin	3764.99	2842.18	-	-
5	Q28749	Fibronectin	1417.83	712.43	91.82	1471.68
6	P47845	Galectin-3	932.81	632.08	-	-
7	P30946	Heat shock protein HSP 90-alpha	5354.57	4002.75	-	-
8	P30947	Heat shock protein HSP 90-beta	4210.73	2350.49	-	19.35
9	Q6SQH4	Protein S100-A10	1130.59	345.2	-	-
10	P24480	Protein S100-A11	1765.33	1234.73	-	-
11	P34032	Thymosin beta-4	2549.04	1814.28	-	-

Using STRING bioinformatic platform, we revealed several over-represented Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes signaling pathways (Table 2).

Table 2: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes over-represented signaling pathways by alarmins identified in the study.

KEGG signaling pathway	FDR p-value
Fluid shear stress and atherosclerosis	0.0027
IL-17 signaling pathway	0.0027
Cholesterol metabolism	0.0040
PI3K-Akt signaling pathway	0.0075

References:

1. Uyy, E. *et al.* Endoplasmic Reticulum Chaperones Are Potential Active Factors in Thyroid Tumorigenesis. *J. Proteome Res.* **15**, (2016).

The complex biochemical and mass spectrometry analysis are now in full progress. Aorta, coronary and carotid vascular fragments will be processed following the work flow shown in Fig.1. In parallel blood samples will be also analysed and the best candidates for molecular biomarkers will be validated by alternative methods (immunological, qPCR, immunohistochemistry). At least two scientific papers were in preparation to be submitted to peer review journals in the field.

2. Transnational collaboration

Describe the added value and synergies in the collaboration, any obstacles to the transnational collaboration, and the proposed solution (if necessary) (Max. 1 page).

The partner P2 appreciate very much the discussion we had with the CO in establishing the experimental model, in timing of harvesting the samples and the treatment delivery. The useful exchanging of ideas and significant references through the emails and regular skip meetings contribute to the adequate development of the project.

QUESTIONNAIRE / PROJECT IMPACT ASSESSEMENT

This questionnaire, to be filled by the project's coordinator, is part of the 2nd year's progress report (and is also included in the final report). It is for internal use by the ERA-NET ERA-CVD consortium in order to assess funded projects outputs. The results of this questionnaire will be presented in network meetings and included in public reports.

A. COMPOSITION OF THE CONSORTIUM

1. Please indicate the number and type of **entities** composing the consortium.

Type of entities	Total N°
Academia	2
Company	1
Clinical partner	1
Patient organisation	-
Other (Please specify: ……)	-

Add lines as appropriate

2. Please indicate the composition of the consortium in terms of gender balance.

Partner P1: ICBP N Simionescu	Total N° : 8
Females	6
Males	2

B. EXPECTATIONS VERSUS ACHIEVEMENTS

For each of the following areas, please rate to which extent (high, medium, low) you feel your project was expected to contribute and to what extent it has been contributing:

	Expected			Achieved		
	High	Medium	Low	High	Medium	Low
Scientific knowledge in some specific field	x			x		
Applied research and/or proof of concept	x			x		
Translational Research		x			x	
Impact on public health	x				x	
Research networking	x			x		
Training and capacity building	x			x		
Other (Please specify: new job creation)	x			x		

C. SCIENTIFIC KNOWLEDGE - PUBLICATIONS AND COMMUNICATIONS (after starting the project)

In the following tables, please list the **joint publications** and **communications** (in which ERA-CVD support was acknowledged) that resulted from the funded project (with at least two partners involved), underlining the name of the partners. In column "Partner(s) involved", please point out the project partners involved by using the numbering employed in the project proposal (e.g. partner 1 or P1).

1. Master and PhD theses

Master/PhD	Authors, title, year	Partner(s) involved
Master degree (2018-2020)	Aurel CERVEANU-HOGAS, Proteomic changes in carotid arteries induced by a hyperlipidaemia diet in New Zeeland White Rabbits, 2020	**P1**

Add lines as appropriate

2. Communications in scientific congresses

Authors, title, meeting name & place, year	Partner(s) involved	Type of presentation (Oral Communication/ Poster)
- Felicia Antohe. Toward precision medicine on the road from cell receptors to cell proteomics. The 40th ICBP NS Anniversary Symposium, Bucharest, 19-20 September 2019.	P1	Oral Communication
- Elena Uyy, Luminita Ivan, Viorel-Iulian Suica, Raluca Boteanu, Rune Hansen, Felicia Antohe. Alarmins expression in atherosclerotic lesions under severe anti-hyperlipidemic treatment; a mass spectrometry based proteomic approach. The 40th ICBP NS Anniversary Symposium, Bucharest, 19-20 September 2019.*	P1,CO	Poster
- Aurel Cerveanu-Hogas, Elena Uyy, Luminita Ivan, Viorel-Iulian Suica, Raluca Boteanu, Rune Hansen, Felicia Antohe. Mass spectrometric analysis of thoracic aorta alarmin profile in experimental atherosclerosis. 13th Central and Eastern European Proteomic Conference (CEEPC) Ustron, Poland, 23-25.09.2019.*	P1, CO	Oral Communication

-Viorel-Iulian Suica, Raluca Maria Boteanu, Elena Uyy, Luminita Ivan, Aurel Cerveanu-Hogas, Rune Hansen and Felicia Antohe. The proteomics of exosome alarmins as critical inflammatory players in coronary artery diseases.* 33rd World Congress on Cardiology and Heart Diseases, Prague, Czech Republic, 27-28.03.2020, (canceled event because of COVID 19).	**P1, CO**	**Poster**

D. USE OF SHARED RESOURCES/FACILITIES

1. Please indicate the number and designation of **shared resources** used within the framework of the current project.

Type of resources	Designation	Total N°
Existing cohorts		
Existing registries		
Biobanks		
Existing patient databases & corresponding biological material		
Innovative and shared technologies (e.g. OMICS, new generation	High performance LC/MS/MS tandem mass spectrometry proteomics	
Cellular and/or animal models	Experimental atherosclerotic New Zeeland White Rabbit model	40 males
Others (Please specify: ……)		

Add lines as appropriate

E. PUBLIC HEALTH IMPACT

1. Is the project expected to produce any result or finding that can be translated into a real impact on human health? YES

The project generated a list of alarmins highly expressed in the lesion in different stages of development that will represent a valuable asset for elaboration of clinical strategies for early detection and treatment of atherosclerosis. The best biomarkers will be selected to be used with the new multi-frequency ultrasound technology for improved evaluation and diagnosis of coronary plaque.

2. Has the project already produced any result or finding that can be translated into a real impact on human health? YES

Direct demonstration of proteome changes of the atherosclerotic lesions in different stages of development of the diseases that will be included in ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository data sets, free to be used by anyone.

3. If the answer to the questions G. 1 and/or G.2 was "YES", please indicate in what field(s) the results generated within the framework of the current project are expected to impact?

- Prevention
- Prognosis x
- Diagnosis x
- Therapy

4. Please list the major achievements of the consortium that can be translated into real impact on human health.

Achievements	YES/NO	Please specify (if YES)
Development of new preventive guidelines		
Development of new prognostic measures		
Development of new diagnostic products	Yes	List of alarmins up or down regulated in atherosclerosis, to be deposited in ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository international data sets.
Development of new diagnostic techniques	yes	Multi-frequency ultrasound technology for improved evaluation and diagnosis of coronary plaque.
Development of new diagnostic guidelines		
Development of new therapeutic products	yes	New alarmin biomarkers related to plaque progression
Development of new therapeutic techniques		
Development of new therapeutic guidelines		
Other achievements		

Add lines as appropriate

F. JOB CREATION

1. Please list below the number of **jobs** created within the framework of the current project (Pos-Doc fellowships & Contracts)

Partner #		Name	Gender	

	Type (Post-doc fellowship/ Contract)		**F**	**M**	**Duration of the fellowship/contract** months/years
ICBP NS	Master thesis and Research Assistant Contract	CERVEANU-HOGAS Aurel		x	Contract for at least 3 years

Add lines as appropriate

G. DISSEMINATION TO THE GENERAL PUBLIC

1. Which of the channels below were used to disseminate the results of the project to non-academic audiences and general public?

Dissemination channels	**YES/NO**	**Please specify (if YES)**
Project website	Yes	http://www.icbp.ro/static/en/en-networking_grants-grants-international/xplorecad.html
Presentations in non-scientific events, open days, etc.	Yes	Open access days of ICBP NS organised every year for young students to visit the research laboratories.
TV, Radio, Magazines, newspapers		-
Social Networks (twitter, linkedin, facebook, etc)		-
Internet (posting project news and communications in websites)	Yes	www.icbp.ro , P1 web site
Other channels		Central and Eastern European Proteomic Conference (CEEPC).

H. PARTNERSHIP AND CONSORTIUM SUSTAINABILITY

1. Did the partners of this project collaborate before applying for ERA-CVD joint transnational call (JTC)? YES

►If YES, please specify which partners (name, institution, country) were collaborating before and list the funding received (if applicable).

SINTEF (CO) and ICBP N.Simionescu (P1) collaborated previously in the MULTIBUBBLE (RCN FRINATEK, 2015-2018) project aiming to develop a new platform based on novel multifunctional nanoparticle-stabilized microbubbles and ultrasound technology for tergeted therapy of cancer and atherosclerosis.

2. Did you find any partners via the ERA-CVD Partnering Portal? YES/NO

►If YES, please specify which partners (name, institution, country) were found via the ERA-CVD Partnering Portal.

3. During the lifetime of the project, was there any new collaboration between any of the project participants and groups outside the consortium? YES/NO

►If YES, please specify which partners (name of researcher, institution, country) established new collaborations and with which groups (including other project consortia granted by ERA-CVD).

4. Has the participation in the project resulted in new scientific collaborations or partnerships between two or more of the project participants? YES

►If YES, please specify the partners (name, institution, country) involved.

The present collaboartion resulted in a new scientific research project with title: ***'A novel ultrasound-based therapeutic platform to enhance delivery of ApoA-1 encoding plasmid DNA for cardiovascular protection'*** by subitting a new applicationtion to The Norway Grants Call for Proposals 2019-Collaborative Reseach Projects with two Romanian partners and three colaborators from Norway:

CO: Felicia ANTOHE from Institute of Cellular Biology and Pathology N. Simionescu, Bucharest, Romania; **P1**: Runa HANSEN, from SINTEF AS, Trondheim, Norway; **P2**: Stefana PETRESCU, Biochemistry Institute, Bucharest, Romania; **P3**:Per SONTUM, Phoenix Solutions AS, Oslo, Norway; **P4**: Angelsen Bjørn, Surf Technology AS,Trondheim, Norway.

The project aim is, to improve the transfection rate of pDNA in the hepatocytes of the liver in order to obtain a systemic effect by elevating serum apoA-1 concentrations, affecting the cholesterol efflux and reducing the atherosclerotic burden, by combining ultrasound, microbubbles and liposomal pDNA.

Tissue engineering of blood vessels using three-dimensional bioprinting of endothelial and smooth muscle progenitor cells
PN-III-P1-1.1-PD-2016-1660, No. 19/2018 acronym BIOPRINT,
Phase report III-2020

Introduction

3D Bioprinting is a technique used for manufacturing tissues and organs that mimic the architecture of natural tissues. 3D bioprinting combines cells, growth factors and biomaterials to create a setting in which cells grow and differentiate into native tissue-like structures. In 3D bioprinting, biomaterials are printed layer by layer to produce structures similar to a desired organ or tissue. The first patent for this technology was proposed in the United States in 2003 and granted in 2006 [1]. Bioprinting involves several steps: (i) biomaterial selection, (ii) designing the bioprinting model/scaffold using CAM software, (iii) bioprinting the model using proper bioprinting technique, and (iv) analyzing bioprinting constructs [2]. In 3D bioprinting an exhaustive knowledge and methodology approach is needed from various fields such as engineering, stem cell biology, tissue engineering, and biomaterials science to create an ideal model [3]. An ideal scaffold should be biocompatible, non-immunogenic, non-toxic, anti-thrombotic, with vasoactive properties, allowing the remodeling of the scaffold post-implant by the host tissue. To create such a scaffold, physicochemical parameters such as geometry, pore size, surface properties, adhesion, degradation and biocompatibility should be analyzed [2-4]. Although there is a wide variety of biological materials, including synthetic polymers, hydrogels, extracellular matrix, cell aggregates, and microcarrier structures, several aspects have to be considered for obtaining structures similar to the target tissue. First of all, an important aspect is *compatibility* of biomaterials with different types of printing technologies. Extrusion printing is the most flexible method due to the simple mechanism and the larger diameters of printheads. Drop or laser printing is only used for hydrogels. The second aspect is the *bioprintability* of scaffolds. In this case, the bioprinting of hydrogels is superior to other bioinks. The third aspect is *replicability*, which implies that the constructs should be as close as possible to the desired tissue. Cell interactions and proliferation, scaffold degradation, are also important for tissue formation. The fourth aspect is related to the *bioprinting resolution*, which depends on bioprinting type as well as on bioink.

Laser bioprinting of hydrogels has a resolution of 5-10 μm, while the drop or extrusion bioprinting between 50-100 μm. The fifth aspect is *accessibility*. Matrigel ™, collagen and fibrin hydrogels are more expensive compared to synthetic polymers. In a scaffold, hundreds of millions of cells are needed so that obtaining them could be intensive, costly and time-consuming. Other aspects involve: *scalability, practicality, mechanical and structural integrity, degradability, commercial availability, immunogenicity* and *applicability*.

Despite the multitude of biomaterials that appear regular, relatively little research has been devoted to the development of biomaterials for the bioprinting process. Although a large number of hydrogels have great potential for tissue engineering, only a limited number can be used in bioprinting due to the lack of bioprintability and toxicity of degradation products. Also, the bioprinter parameters that should be optimized for each specific tissue. The main objectives for improving bioprinting are to minimize cell loss, promote cell-cell interactions, increase mechanical properties, and biocompatibility of 3D bioprinting scaffolds. Amniotic fluid cells are a heterogeneous population of mesenchymal cells of fetal origin of great importance in regenerative medicine. This population is known to have low immunogenicity, so it is less likely to generate an immune response thus having a high therapeutic potential [5, 6]. Phenotypes found in cell culture in amniotic fluid include epithelial-like and fibroblast-like cells [7]. There are also approximately 0.1-0.5% stem cells defined by c-kit expression (CD117+) on the cell surface. The regenerative potential of amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells (AFSC) arises from their ability to differentiate and reduce immunogenicity [8]. AFSC can differentiate into different cell lines, such as endothelial [9], cardiac [10], neural, bone [11]. AFSC can also be reprogrammed without the use of gene transfer technology for induction of pluripotent stem cells [11]. The literature suggests a strong correlation between AFSC and the cardiovascular system. AFSC have demonstrated the ability to form capillary-like networks when grown in hydrogels and there is also evidence of paracrine signaling when AFSC are indirectly co-cultivated with human cardiac cells thereby modulating cardiac regeneration [12, 13].

Cardiovascular diseases are the leading causes of mortality worldwide and require over one million bypass / blood vessel replacements annually in the United States alone [14]. Although autologous vascular grafts are the gold standard for clinical use, they are not suitable for a large number of patients due to vascular disease, amputations or previous vascular tissue harvesting.

Despite the clear clinical needs of vascular substitutes, currently available synthetic grafts (for example, Dacron and Teflon) have proven to be successful only in large caliber implants; small diameter vascular substitutes (<6 mm) have generally unsatisfactory results, with major negative side effects, such as acute thrombosis, hyperplasia and aneurysm [15]. Arterial failures are generally attributed to the relatively low blood flow rate in these small vessels, which increases the rate of interactions between cells and molecules in the blood and polymeric implants. Therefore, there are strict requirements regarding the biofunctionality of the small diameter designed grafts. In order to produce grafts with normal vascular functions, at least 2 requirements must be met: (1) a confluent endothelium providing a nonthrombogenic interface and (2) a smooth contractile muscle tissue that can withstand haemodynamic stress and local changes in blood pressure that occur through constriction and physiological relaxation of the vessel [16]. Tissue engineering has emerged as a promising alternative approach for viable small diameter arterial grafts. Various strategies including decellularized tissue, synthetic polymeric matrices, self-assembling cell layers and hydrogels have been used to create living vascular structures and replace native blood vessels; these strategies have achieved different levels of success. These approaches generally produce vascular substitutes in the form of a robust tubular matrix containing smooth vascular or fibroblast muscle cells followed by seeding and cultivation of endothelial cells to achieve reendothelialization. This multi-step construction process is slow and requires complicated procedures and long manufacturing periods. In addition, grafting and retention rate of endothelial cells is strongly influenced by seeding mode, surface properties, cell density and culture conditions and, therefore, current methods can hardly be considered reliable for generating an intact functional endothelium. Therefore, biomimetic reconstruction of blood vessels through tissue engineering remains a difficult task that requires new construction techniques [17-20]. An important advantage of 3D bioprinting is the ability to build tissue / organ equivalents with a structure as close as possible to the native one. The precise positioning of cell-loaded bioinks simulates the anatomical features of the target tissue / organ, so that as cells proliferate, migrate and differentiate into a biomimetic construct. In particular, coaxial extrusion technique can use various biomaterials for bioprinting resulting in vessel-like structures [21].

For the successful bioprinting of a functional vessel, an essential factor is the bioink used. It must be biocompatible with the different cell types and promote the functionality of the cells and also allow the direct bioprinting of the vessels. While the hydrogels used to create vessels (fibrin, elastin, collagen, fibroin) generally have poor printability, materials suitable for co-extrusion bioprinting (alginate, gelatin methacryloyl, photopolymerized hyaluronic acid) usually have negative results due to low cellular affinity or poor mechanical properties and the functionality of the tissues is impaired. Despite significant improvements of current technologies to create three-dimensional (3D) blood vessels, the formation of a functional engineered vascular system with multiscale vessel networks from capillaries to large vessels has remained challenging in this field. Inability in fabrication of 3D vascular networks has limited tissue engineering in the growth of thick tissue or organ-level constructs [22].

The aim of this project was to create vascular structures using collagen and hyaluronic acid hydrogels and endothelial and muscle progenitor cells derived from mesenchymal stem cells isolated from amniotic fluid using 3D bioprinting.

1. Amniotic fluid stem cells differentiation and characterization

The amniotic fluid cell cultures (AFSC) were kindly provided by Genetic Lab S.R.L. diagnostics laboratory upon informed consent of the patients in agreement with national and EU rules. The primary cultures were obtained by centrifugation of amniotic fluid at 1050 rpm for 10 min. The cells were then cultured for 10 days without passages at Genetic Lab in AmnioMax medium, with medium change every 2 days (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), then delivered to IBPC ‘‘N. Simionescu’’.

1.1. Cell culture and differentiation conditions

After 10 days primary culture was passage and cultured in differentiation specific media supplemented with growth factors. Endothelial differentiation of AFSC was done by cultured in M200 Medium supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum), 40 ng/mL vascular endothelial growth factor (VEGF), 20 ng/ml insulin growth factor (IGF-1), 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF), 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF), 100 μg /mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin, and 50 μg/mL neomycin (all purchase from Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Smooth muscle differentiation of AFSC was done by cultured in M231 Medium supplemented with basic FGF (2 ng/ml), EGF (0.5 ng/ml), heparin (5 ng/ml), IGF (2 µg/ml) and bovine serum albumin BSA (0.2 µg/ml) (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The cells were maintained in these media for 4 weeks, and passage when reached subconfluence. Cell cultures were maintained at 37 °C with 5% CO_2 and 21% O_2 in a humidified atmosphere.

1.2. Flow cytometry assay

Flow cytometry was used for the assessing the expression of cell specific surface markers (Gallios, Beckman-Coulter, California, SUA). AFSC ($1x10^5$ cells/marker) were stained with fluorochrome-conjugated (FITC - Fluorescein-isothiocyanate and PE - Phycoerythrin) primary antibodies against CD29 (integrin β1), CD31 (PECAM-1), CD49e (integrin α5), CD54 (ICAM-1), CD56 (NCAM), CD73, CD90 (Thy-1), CD105 (endoglin), CD146 (MCAM), and VEGFR2 (Beckman-Coulter). AFSC were detached using acutase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and washed in phosphate-buffered saline solution (PBS). Cells were then incubated with the primary antibodies at room temperature in the dark for 30 min. Further, the cells were washed and centrifuged at 400g, 10 min, in PBS (Phosphate Buffer Solution) with 1 % BSA. For negative controls, AFSC were stained with the corresponding isotype-matched IgG antibodies (Beckman-Coulter, California, SUA). Flow cytometry data were analyzed using the Gallios software 1.0 (Beckman-Coulter, California, SUA).

1.3 Gene expression and functional characterization of endothelial progenitor cells (EPC)

Gene expression levels in AFSC and EPC were assessed by qRT-PCR. Total cellular RNA was isolated from cultured cells using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and reverse-transcription reaction was performed using M-MLV polymerase, High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fischer Scientific, USA). mRNA levels of endothelial associated genes (PECAM-1, ICAM-1, VE-Cadherin, eNOS and vWF) were quantified using TaqMan hydrolysis probes (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Quantitative Real Time-PCR reactions were carried out in a real-time thermocycler (ViiA7, Applied Biosystems, USA), following manufacturer's guidelines. The results were expressed using relative quantitation ($2^{-\Delta Ct}$), where ΔC^T represents C_T difference between values for AFSC and EPC.

Dil-Ac-LDL uptake assay. AFSC derived EPC were incubated with 6 µg/mL Dil-AcLDL-PE (Acetylated low-density Lipoprotein conjugated PE, ThermoFischer Scientific, USA).

Cells were incubated for 2 hours at 37 °C with 5% CO_2 and 21% O_2, washed with PBS and fixed with 1%PFA (paraformaldehyde) for 10 minutes at room temperature. **Ulex europaeus lectin (UEA) binding capacity to EPC**. For the assessment of Ulex europaeus agglutinin (UEA) binding capacity to EPC, cells were incubated with 0.01 mg/mL FITC – Ulex europaeus lectin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 2 hours, followed by a wash with PBS. The nuclei were counterstained with DAPI (1 mg/mL). The photomicrographs were taken with a digital camera Digital Net Camera DN100 using an Eclipse TE300 microscope (Nikon, Tokyo, Japan). **Matrigel vascular tubes assay**. To evaluate the formation of blood vessel networks in Matrigel, cells were seeded into 96-well plates at a density of 3,000 cells per well. Briefly, 50 µL of Matrigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added in each well of a 96 well plates, and left to solidify for 30 minutes at 37ºC. After Matrigel polymerization, cell suspension was added and incubated for 4 hours. Tubes formation was observed using an Eclipse TE300 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (Digital Net Camera DN100).

1.4 Gene expression and electrophysiological analysis of smooth muscle progenitor cells (SPC)

mRNA levels of muscular associated genes (smoothelin, calponin 1, α-SMA (α-actin), Myh11 (myosin heavy chain), α-tropomyosin, caldesmon-1, Cav3.1) were quantified using TaqMan hydrolysis probes (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

In patch-clamp experiments we used borosilicate glass capillaries (GC150F-10, Harvard Apparatus, USA) pulled with a PUL-100 equipment (WPI, Sarasota, FL, USA) and fire-polished with a home-made microforge to yield a resistance in solution between 2-3 MΩ. The patch-clamp setup included an inverted microscope placed on an antivibratory platform in a Faraday cage, a stage temperature controller (TC202A, Harvard Apparatus, MA, USA), a resistive feedback amplifer (WPC-100, ESF electronic, Göttingen, Germany) connected to a Digidata 1322A AD/DA interface controlled by the pClamp8.2 software (Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvalle, CA, USA). Briefly, the extracellular solution was composed of: 135mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 0.9 mM $MgCl_2$, 0.33 mM NaH_2PO_4, 10 mM HEPES, 10 mM D-glucose pH 7.40 at 25°C titrated with NaOH. The pipette solution contained: 140 mM KCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.21 at 25°C titrated with KOH. Multiple voltage protocols were applied, including: a general protocol for K^+ currents with depolarization steps from -60 to +60 mV with a duration of 300 ms from a holding potential of -80 mV; a double voltage ramp protocol (from -

120 mV to +80 mV in 2 s and back to -120 mV at the same time, from a holding potential of -70 mV) (I NS double-ramp); a protocol for voltage-dependent Na + currents with depolarization steps from -60 to +40 mV with a duration of 6 ms from a holding potential of -100 mV; standard protocol 2 of voltage-clamp for the separation of the current of Ca2 + type L from the current of Na + voltage-dependent. We applied the following pharmacological compounds: iberiotoxin 100nM (Alomone Labs, Jerusalem, IL), phrixotoxin-1 280µM, DIDS (stilbene disulfonate) 100 µM, mibefradil 10 µM, and nifedipine 1 µM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2. Design, bioprinting and characterization of blood vessel constructs using collagen-hyaluronic acid hydrogels and EPCs and SPCs

A computer-aided design (CAD) software (BioCad, RegenHU, Switzerland) was utilized to create the 3D models for bioprinting. A G-code series of instructions to be used by the 3D bioprinter (3D Discovery, RegenHU, Switzerland). The 2 printheads (one with bioink and EPC and the second with bioink and SPC, respectively) moved according to G-code instructions depositing bioink on circular slides. Bioprinting parameters were: 0.2 mm diameter needle, 1.2 bar extrusion pressure, 1 mm/sec printhead speed rate, 18ºC temperature. The diameter of vascular tubes was 2.5 mm, and thickness and height of each layer were 0.3 mm. A 5 seconds polymerization followed each bioprinted layer. The number of cells was 10 million cells/1 ml Coll-HA hydrogel. The amount was sufficient for printing 10 constructs.

2.1 Hydrogel preparation

Collagen hydrogel (H0) containing 2% peptides (collagen) used was purchased from RehenHu (Villaz-St-Pierre, Switzerland). Using this hydrogel, we developed other 2 hydrogels (H25, H50) by adding hyaluronic acid (MW 1-1.6 MDa, 1%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 2 different proportion, 25% and 50%, respectively.

2.2. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), Thermal gravimetric analysis (TGA) and Scanning Electron Microscopy (SEM)

FTIR spectra were recorded with a Nicolet iS50R spectrometer, at room temperature, in the measurement range 4000–400 cm^{-1}. Spectral collection was carried out in ATR mode at 4 cm^{-1} resolution. For each spectrum, 32 scans were co-added and converted to absorbance using OmincPicta software (Thermo Scientific).

The thermogravimetric measurements were made on a TGA 851e from Mettler−Toledo. The microbalance has a precision of ±0.1 mg and was kept at constant temperature (22 °C) during analyses to avoid the variation of mass measurement with temperature. Samples with a mass between 1 and 3 mg were placed into 70 µL alumina pans. Samples were heated between 25 and 800 °C at 10 °C/min under air flow (50 mL/min).

SEM imaging was obtained using the following protocol. The constructs were washed with PBS and fixed in 2.5 % glutaraldehyde for 1 hour at room temperature. Glutaraldehyde was then removed, and successive dehydration was carried out in ethanol (40 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, and 100 %) for 10 minutes each. SEM analysis was performed on a HITACHI S2600N electron microscope, at 25 keV, on samples covered with a thin silver layer.

2.3 Water uptake

Water uptake was performed to demonstrate the hydrogel swelling behavior in the presence of PBS (phosphate buffer saline). Bioprinted constructs were weighted after printing, then immersed into PBS and weighed at 10 min, 30 min, 1hr, 2hrs, 4hrs, and 8hrs, respectively. The absorption rate was calculated according to the formula:

$$\text{Water uptake} = \frac{Ww - Wd}{Wd\ (g/g)} \times 100$$

where: Ww = construct weight after immersion in the fluid at time t; Wd = construct weight before immersion

2.4 Enzymatic degradation

Enzymatic degradation of the constructs was assessed using collagenase type I and hyaluronidase. Bioprinted vascular constructs were introduced into culture medium (control constructs) and in collagenase type I and hyaluronidase medium (10 µg/ml collagenase and 10 µg/ml hyaluronidase, Merck, New Jersey, USA) and then weighed at different intervals time (10 min, 30 min, 1hr, 2hrs, 4hrs, and 8 hrs). Weight loss was calculated using formula:

$$\%\ \text{Weight loss} = \frac{Wi - Wt}{Wi\ (g/g)} \times 100$$

where: Wi = construct weight in collagenase free medium; Wt = construct weight in collagenase type I medium

3. Characterization of blood vessel constructs populated with EPCs and SMPs

3.1 Viability, morphology and oxidative stress assays

EPCs and SMPs behavior at 7 and 21 days after bioprinting was evaluated using LDH, GSH, and MTT assays, as well as and SEM. Cellular viability after 7 days and 21 days was evaluated using an **LDH assay** (Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA). Lactate dehydrogenase (LDH) is a cytosolic enzyme present in many different cell types. Plasma membrane damage is followed by the release of LDH into the cell culture media. LDH can be quantified by a coupled enzymatic reaction in which LDH catalyzes the conversion of lactate to pyruvate via NAD+ reduction to NADH. Diaphorase then uses NADH to reduce a tetrazolium salt to a red formazan product that can be measured at 490 nm. Briefly, 50µL of each sample medium was transfer to a 96 well plate and then add 50µL of Reaction Mixture. The plate was incubated at room temperature for 30 minutes protected from light. Then was added 50µL of Stop Solution to each sample well and mixed by gentle tapping. The absorbance was measured at 490nm and 680nm using TECAN Infinite M200 (Männedorf, Switzerland).

Cellular stress was evaluated using **GSH assay** (Glutathione Fluorescent Detection Kit, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA). Glutathione (GSH) is an antioxidant found in eukaryotic cells. Reactive chemical species can cause a drop in GSH levels either by oxidation or reaction with the thiol group. A change in GSH levels is important for assessing toxicological responses and can promote oxidative stress, potentially leading to apoptosis and cell death. The protocol followed the manufacturer specification, using a standard for absolute quantification. The fluorescent emission was read at 510 nm, with excitation at 390 nm using a TECAN Infinite M200 spectrophotometer (Männedorf, Switzerland).

The viability and proliferation were assessed using **MTT assay** (Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA). The assay is a colorimetric method that allows quantitative assessment of proliferation, cell viability and cytotoxicity. The viable cells reduce yellow tetrazolium salt MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) to a dark blue formazan via mitochondrial enzymes. Briefly, the constructs cultivated for 7 days and 21 days respectively in 24-well plates, were incubated with 15 µl Solution I (MTT) at 37°C for 4 hours. Solution II (containing solubilization agents SDS and HCl) was added and pipetted vigorously to solubilize formazan crystals. After 1 hour the absorbance was read at 570 nm (TECAN Infinite M200, Männedorf, Switzerland).

The cellular morphology and distribution were evaluated using SEM, following the protocol described under 2.2 materials and methods section.

3.2 ELISA and Griess assay

The secretion of VEGF A from the endothelial progenitor cells at 7 days and 21days of culture in the constructs was measured using Human VEGF ELISA kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to manufactured protocol. Nitric oxide (NO) was measured spectrophotometrically at 548 nm using the Griess Reagent Kit for Nitrite Determination (Molecular Probe, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA).

3.3 Immunohistochemistry

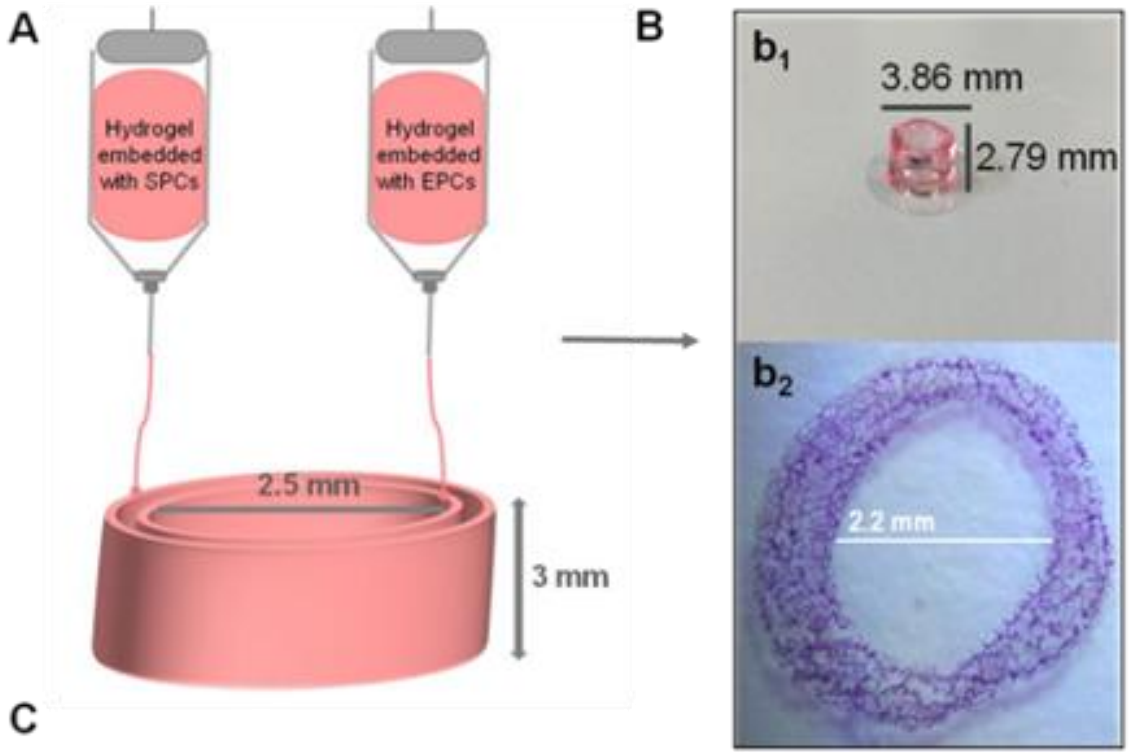
Immunohistochemistry was performed on 5 μm-thick cryosections on constructs at 21 days post-bioprinting. The sections were then incubated overnight, at 4°C, with the following primary antibodies: monoclonal mouse anti-human CD31 (1:250), CD144 (5 μg/mL), smoothelin (1:100), and anti-human μtropomyosin 1 (1:100) (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA). The slides were washed three times with PBS, for 10 min., and then incubated for 2 hours at room temperature, with the secondary antibodies. The pictures were taken using an inverted microscope with an incorporated digital camera system for imaging (Olympus CKX41 equipped with Sense XC30 camera, Shinjuku, Tokyo, Japan).

Data analysis

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD) or mean ± standard error of the means (SEM), as appropriate. In all instance's "n" signifies the number of cells analyzed in a certain experimental condition. Statistical analysis was performed using Student's t test or Fisher's exact probability test, using a critical level of $p < 0.05$. For immunophenotyping and gene expression profiling, statistical analysis was performed using the one-way ANOVA method for correlated samples.

Results and Discussions

The schematic diagram in Fig. 1A shows the bioprinting procedure. The vascular model was designed using the BIOCAD software. A 10-layer vascular construct having an internal diameter of 2.5 mm and a height of 3 mm was bioprinted using 2 printheads, one with Coll-HA hydrogel embedded EPC and second with Coll-HA hydrogel embedded SPC. After each layer, the polymerization module was inserted. The Coll-HA hydrogel polymerization was performed by exposure to UV for 5 seconds / layer. Working pressure has been established according to the physicochemical properties of the printed hydrogels. The optimal pressure was 1.1 - 1.2 bar (Fig. 1C). Printhead speed is a very important parameter for printing, and is dependent on the physico-chemical properties of the hydrogels. At a too high speed it does not close the vascular structure, and at a low speed it creates a thick layer that leads to the formation of a vascular construct over the desired size. The printing speed was set at 1 mm / sec using a needle with 0.2 mm internal diameter. For optimum printing, the hydrogels were printed at 18ºC, with the 3D bioprinter (3D Discovery, RegenHu, Switzerland) which have the possibility to adjust the printhead temperature. Using these parameters, were bioprinted vascular constructs with an internal diameter of 2.46 mm (± 0.41), wall thickness of 1.4 mm (± 0.10) and a height of 2.79 mm (± 0.05) (Figure 1B). These results show that the Coll-HA hydrogels can be used for vascular constructs and meet the desired requirements for reproduce with accuracy the model created in the BIOCAD software.



C

Needle diameter	Pressure	Printhead speed rate	Temperature	No of layers	UV	Diameter	Height
0.2 mm	1.2 bar	1 mm/sec	18°C	10	5 sec/layers	2.5 mm	3 mm

Fig. 1 Schematic diagram of bioprinting constructs (A) and optimal printing parameters of collagen-hyaluronic acid hydrogels based vascular construct (C). Macroscopic morphology (B, b_1) and H&E section of vascular constructs (B, b_2)

Other studies have shown that large wall thicknesses of vascular constructs may limit the transfer of oxygen and nutrients, while very small wall thicknesses would impair cells to align and spread reducing the mechanical strength [23, 24]. For these reasons, the nozzle made of a 0.2 mm internal needle was chosen for experiments, which were expected to meet both requirements for allowing sufficient nutrients diffusion and supporting cell growth. By optimizing the printer parameters, we continuously extruded smoothly hollow tubes with desired shapes and dimension.

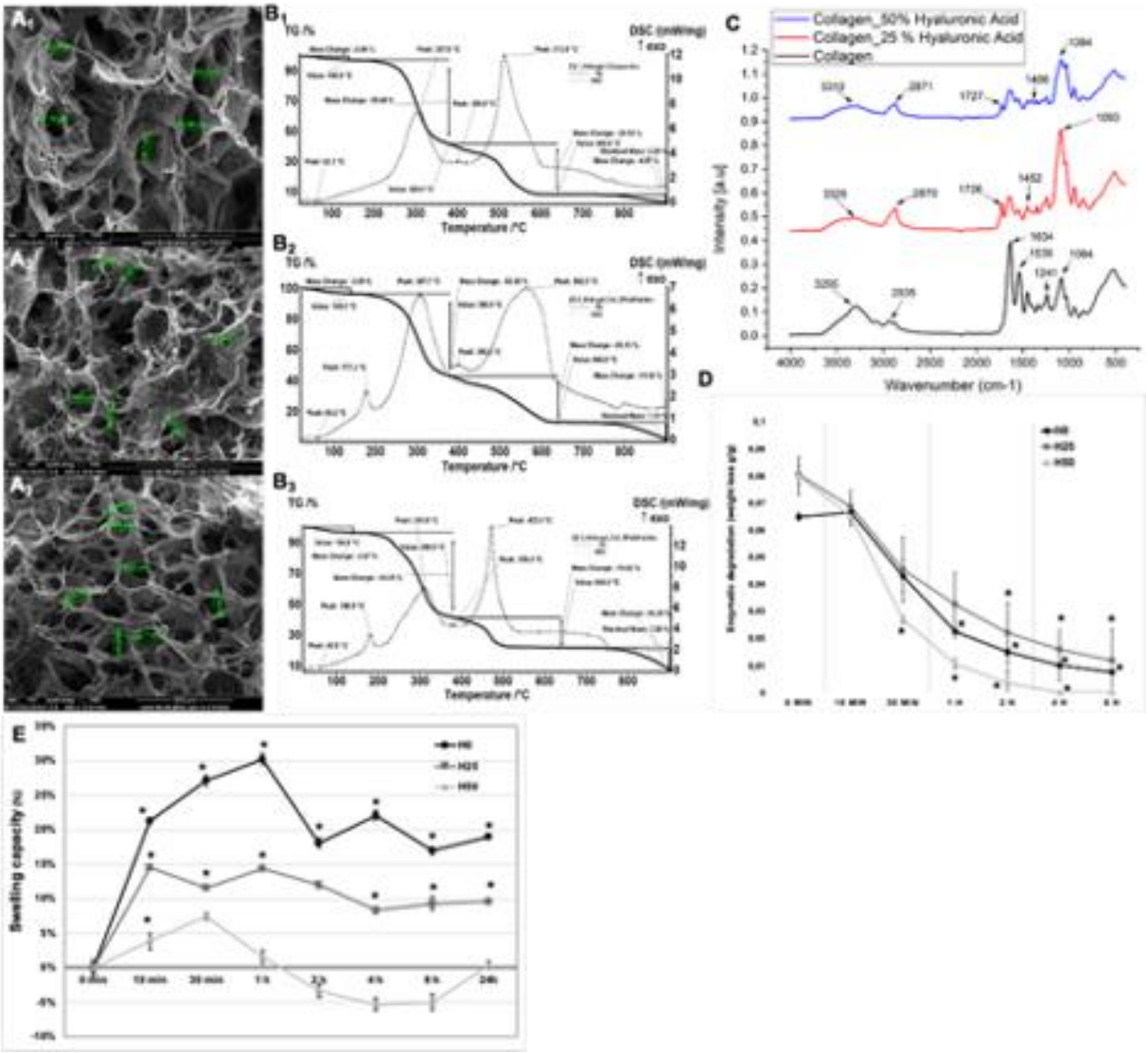


Fig. 2 Coll-HA hydrogels characterization by SEM (H0-A_1; H25-A_2; H50-A_3), TGA (H0-B_1; H25-B_2; H50-B_3), FTIR (C), enzymatic degradation (D), swelling capacity (E).

The morphology of Coll-HA hydrogels was assessed by SEM. The hydrogels present a characteristic porous morphology, the pore size was 107 µm ±23 µm for H0 hydrogel (Fig. 2 A_1), 51 µm ±20 µm for H25 hydrogel (Fig. 2 A_2), and 91 µm ±7 µm for H50 hydrogel (Fig. 2 A_3). The number and pore size are essential for cell growing, proliferation and adhesion, it has been considered that a pore size between 40-200 µm is appropriate to create an adequate microenvironment for cell development and tissue formation [25].

The hydrogel loses 2.66% of the mass in the RT-140°C interval, the process being accompanied by an endothermic effect with a minimum of 62.3^{o}C. In the interval 140-380°C the sample suffers a mass loss of 55.46%, the process being accompanied by a strong, wide exothermic effect, with a maximum at 307.8^{o}C. This is a process of oxidative degradation (parts of organic compounds are oxidized and at the same time chain breaks occur). In the range of 380-440°C there is a slower loss of mass, accompanied by a series of exothermic effects, superimposed, of lower intensity, indicating oxidation of some organic residues. Furthermore, the carbon mass remaining after oxidation undergoes a combustion process at CO_2 up to 640°C. This burning process is accompanied by an exothermic effect, very intense, slightly asymmetrical with a maximum of 513°C. The weight loss over the entire range is 33.53%. After 800°C the sample loses 4.87% of the initial mass, the residue representing 3.2% (Fig.2 B_1). The hydrogel with 25% hyaluronic acid is similar to the previous one, except for the exothermic effect at 177.3^{o}C, which could be due to a reaction that takes place between hyaluronic acid and collagen (Fig.2 B_2). The hydrogel with 50% hyaluronic acid also retains a higher mass of residue between 650-850°C (Fig.2 B_3), suggesting the role of hyaluronic acid in stability of hydrogels.

In order to determine the presence of the functional groups characteristic of the compounds used in the material synthesis, the FT-IR analysis was performed on the samples of collagen, collagen and 25% hyaluronic acid and respectively collagen and 50% hyaluronic acid. The spectrum obtained in figure 2C shows the absorption bands in the range 4000-400 cm-1.

The FTIR spectrum for the collagen hydrogel shows its specific absorption bands at 3295 cm-1 representing amide A and at 2935 cm-1 representing amide B. At the wave number 1634 cm-1 is present amide I characterized by the presence of groups C = O. 1539 cm-1 is the wave number assigned to amide II, where the vibration for the N-H and C-N groups is present, respectively. The case of the wave number 1241 cm-1 shows the appearance of amide III correlated with the C-N and N-H vibrations. The absorption band at 1084 cm-1 is characteristic of the tensile vibration of the C-O bond (Fig. 2C).

The presence of hyaluronic acid in the analyzed samples can be observed in comparison with the spectrum obtained for the collagen control sample.

The absorption band from approximately 3325 cm-1 (for the sample with 25% hyaluronic acid) and 3310 cm -1 (for the sample with 50% hyaluronic acid) is assigned to the OH and NH groups present in the structure of hyaluronic acid.

At the wave number of approximately 2870 cm^{-1} the vibration characteristic of the C-H group is observed. The value of the wave number of approximately 1400cm^{-1} is attributed to the COO- characteristic extent of the acid group in hyaluronic acid. At about 1080 cm-1 the C-OH group is highlighted. The spectra recorded for the hyaluronic acid samples indicate at the wave number of approximately 1726 cm^{-1} the presence of the carboxyl groups C = O (Fig. 2C).

Enzymatic degradation of the constructs was revealed using type I collagenase and hyaluronidase. Bioprinted vascular constructs were immersed in culture medium (control constructs) and in collagenase type I and hyaluronidase medium (10 μg / ml) and weighed at different intervals of time (10 min, 30 min, 1 hour, 2 hours, 4 hours, and 8 hours). The results showed a 33,8% weight loss at 30 minutes, followed by 34,6% at 1 hour, 76,9% at 2 hours, 84,6% at 4 hours and 88,4% at hours for collagen H0 construct (Fig. 2D). The H25 construct weight loss of 43,4 % of mass after 30 minutes, followed by 40,3% after 1 hour, 27,3% after 2 hours, 19% after 4 hours and 14% after 8 hours in the presence of collagenase type I and hyaluronidase. The most biodegradable construct was H50, after 4 hours entire construct was disintegrated in the medium (Fig. 2D).

The swelling capacity experiments showed that the H0 construct absorbs maximum of PBS at 1 hours after immersion, having a weight gain of 30,2% against the control construct. At 2-24 hours the values remain between 16-22%. In H25 construct swelling capacity is lower than in H0 construct, the maximum weight gain being 14,3% after 1 hour in the PBS (Fig. 2E). Furthermore, the H50 construct showed the lowest swelling capacity, with just 7,4% weight gain after 30 minutes in PBS (Fig. 2E). These results suggest that hyaluronic acid liberate water from the construct.

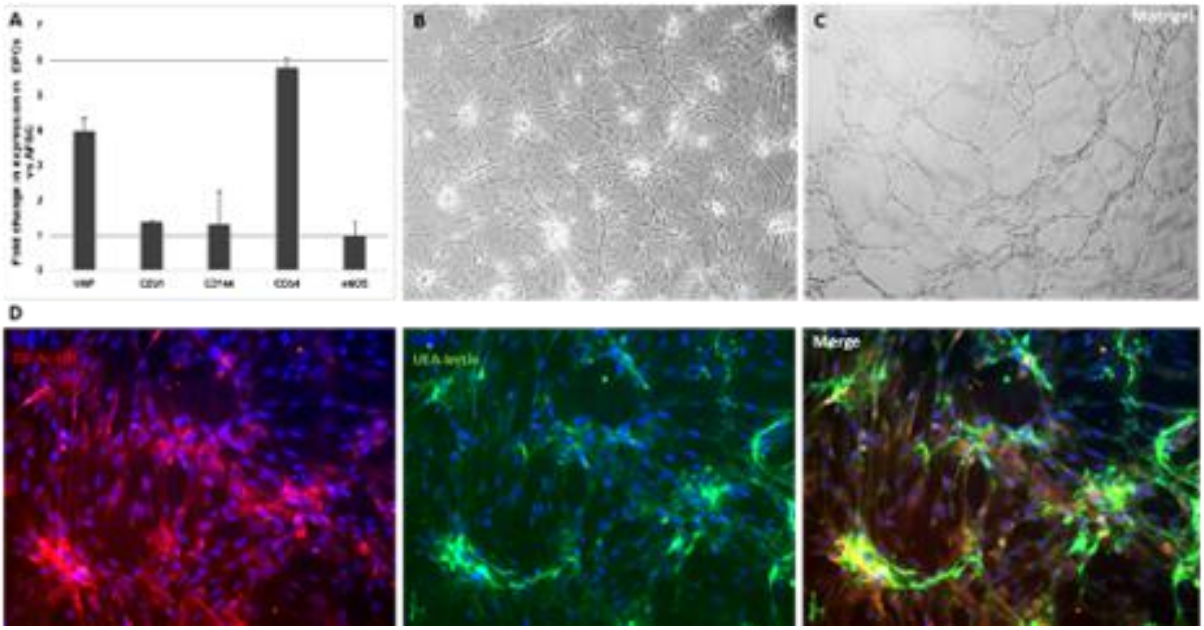


Figure 3. Characterization of differentiated EPC from amniotic fluid stem cells. A. qRT-PCR for detection of specific endothelial markers. B. Optical microscopy images of EPC cultures developed at 14 days in the presence of specific growth factors. C. Matrigel vascular tubes assay to evaluate the formation of blood vessel networks. D. Fluorescence images of EPC incorporating Dil-Ac-LDL and binding UEA-lectin.

Differentiation of EPC from AFSC was occurs after 10 days cultivation in endothelial specific medium supplemented with 40 ng/mL VEGF, 20 ng/ml IGF-1, 10 ng/ml EGF, and 10 ng/ml bFGF. After 10 days cells change the morphology from a fibroblast-like phenotype to an epithelia-like phenotype (Fig. 3B). The cells start to express endothelial specific markers such as vWF, CD31, CD144, CD54 and eNOS (Fig. 3A). The differentiate AFSC are capable to form vascular networks when are cultivate on Matrigel (Fig. 3C). Furthermore, these cells are capable to incorporating Dil-Ac-LDL and binding UEA-lectin (Fig. 3D), suggesting un endothelia cell phenotype.

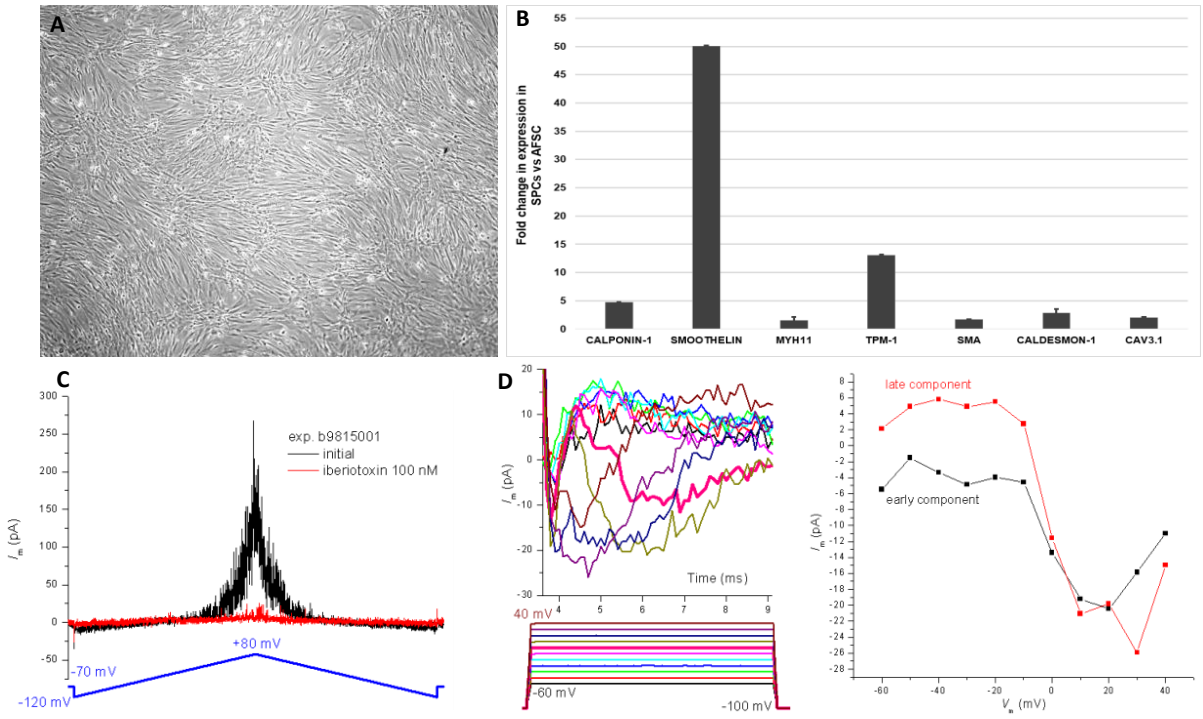


Figure 4. Characterization of differentiated SPC from amniotic fluid stem cells. A. Optical microscopy images of SPC cultures developed at 14 days in the presence of specific growth factors. B. qRT-PCR for detection of specific endothelial markers. C. Inhibitory effect of 100 nM iberiotoxin on BK current fluctuations at positive potentials, highlighted by a double-ramp voltage-clamp protocol. D. Inward current components suggestive of I_{CaT} and I_{CaL}

Differentiation of SPC from AFSC was occurs after 10 days cultivation in smooth muscle specific medium supplemented with FGF (2 ng/ml), EGF (0.5 ng/ml), heparin (5 ng/ml), IGF (2 µg/ml) and bovine serum albumin BSA (0.2 µg/ml). After 10 days in culture cells presents a specific morphology, with a fusiform shape (Fig. 4B). The cells start to express smooth muscle markers such as calponin-1, smoothelin, myh11, tpm-1, SMA, caldesmon-1, cav3.1 (Fig. 4B). Furthermore, using a double-ramp voltage-clamp protocol we demonstrate the presence of BK current fluctuations at positive potentials (Fig. 4C) and inward current components suggestive of I_{CaT} and I_{CaL} calcium channels (Fig. 4D).

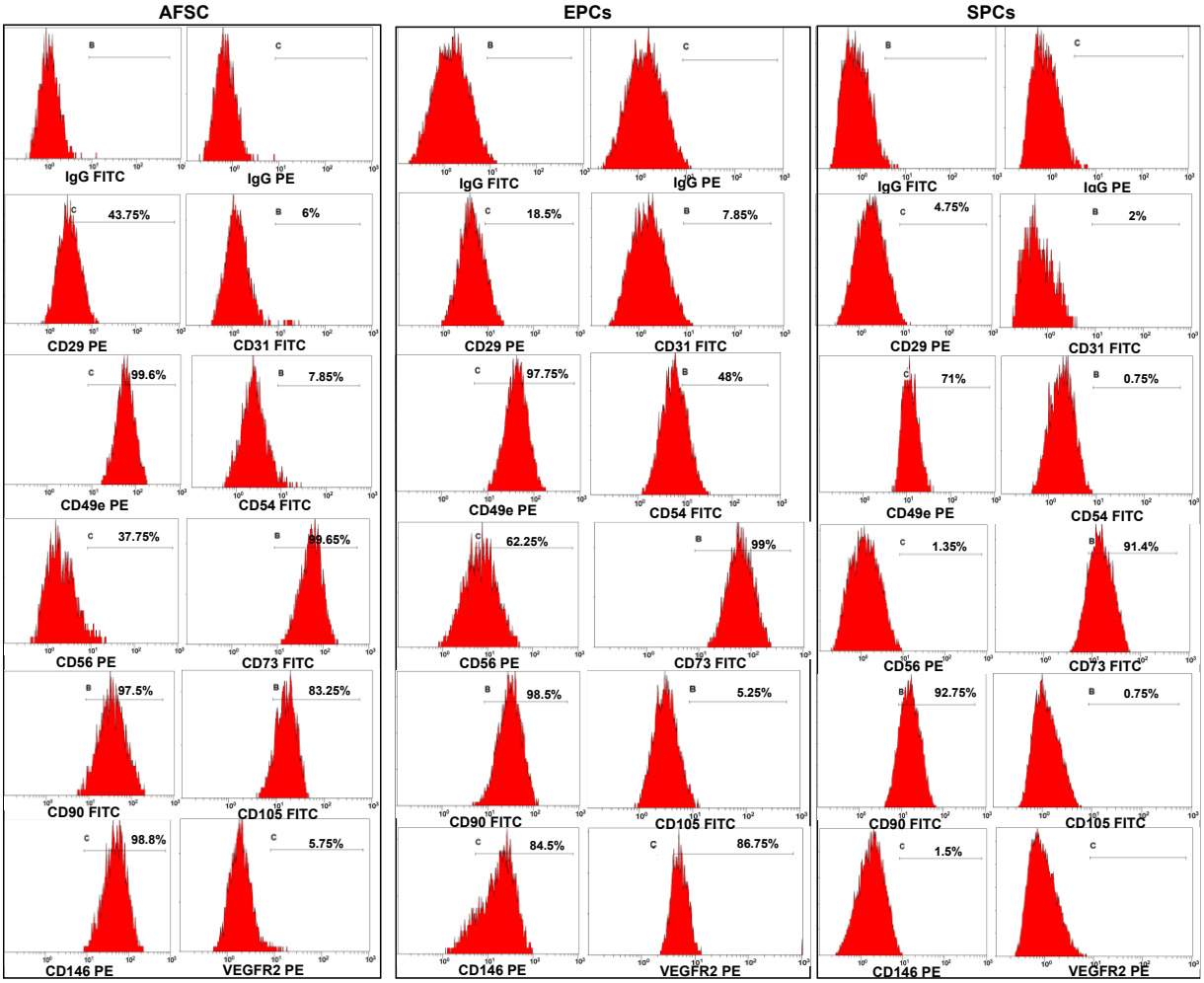


Figure 5. The immunophenotype of differentiated EPC and SPC from amniotic fluid stem cells after 10 day in the presence of specific growth factors

AFSC cultured in BIOAMF medium exhibits a mesenchymal phenotype characterized by surface markers CD29 (43,75%), CD49e (99.6%), CD54 (99,65%), CD56 (37,75%), CD73 (99.65%), CD90 (97,5%), CD 105 (83,25%) and CD146 (99,8%) (Fig. 5). CD29 is β1 integrin, associates with integrin α1 and α2 forming collagen receptors. It is expressed on the surface of mesenchymal cells and generally on the surface of the adherent cells where it binds the actin cytoskeleton with the extracellular matrix and transmits two-way signals between the extracellular matrix and the cytoplasm. Homing cellular adhesion molecule (HCAM) is a surface glycoprotein involved in cell-cell interactions in cell adhesion and migration.

CD44 may also function as a receptor for hyaluronic acid and may interact with other ligands such as osteopontin, collagen and matrix metalloproteinases. CD49e is α5 integrin which in combination with β1 integrin forms the fibronectin receptor. CD56 (NCAM) is part of the adhesion molecule family being neuronal cells. Data from the literature and previous results have shown that AFSC have an increased potential for differentiation in neural cells, so the medium in which they are cultivated and the duration of cell cultures is very important [13]. CD73 and CD90 are markers specific to mesenchymal adherent cells.

AFSC in the presence of EGM-2 medium supplemented with 40 ng / ml VEGF, 20 ng / ml IGF-1, 10 ng / ml EGF, 10 ng / ml βFGF showed the presence of endothelial cell-specific surface markers after 2 weeks. Flow cytometry assay revealed endothelial cell markers present on the surface of cells: CD31 (8%), CD54 (48%), CD146 (84,5%), VEGFR2 (86,75%) (Fig. 5). CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule) is a platelet and endothelial cell specific adhesion molecule involved in angiogenesis, vasculogenesis, integrin activation and leukocyte migration. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) is an immunoglobulin family glycoprotein mediated on the surface of immune and endothelial cells, facilitating transmigration of leukocytes through vascular endothelium. CD105 (endoglin) is a protein involved in angiogenesis being found on the surface of vascular and endothelial progenitor cells.

AFSC growth in smooth muscle specific media, present only CD49e (71%), CD56 (91,4%) and CD73 (92,7%), suggesting a modification of protein expression towards a specific cell type (Fig. 5).

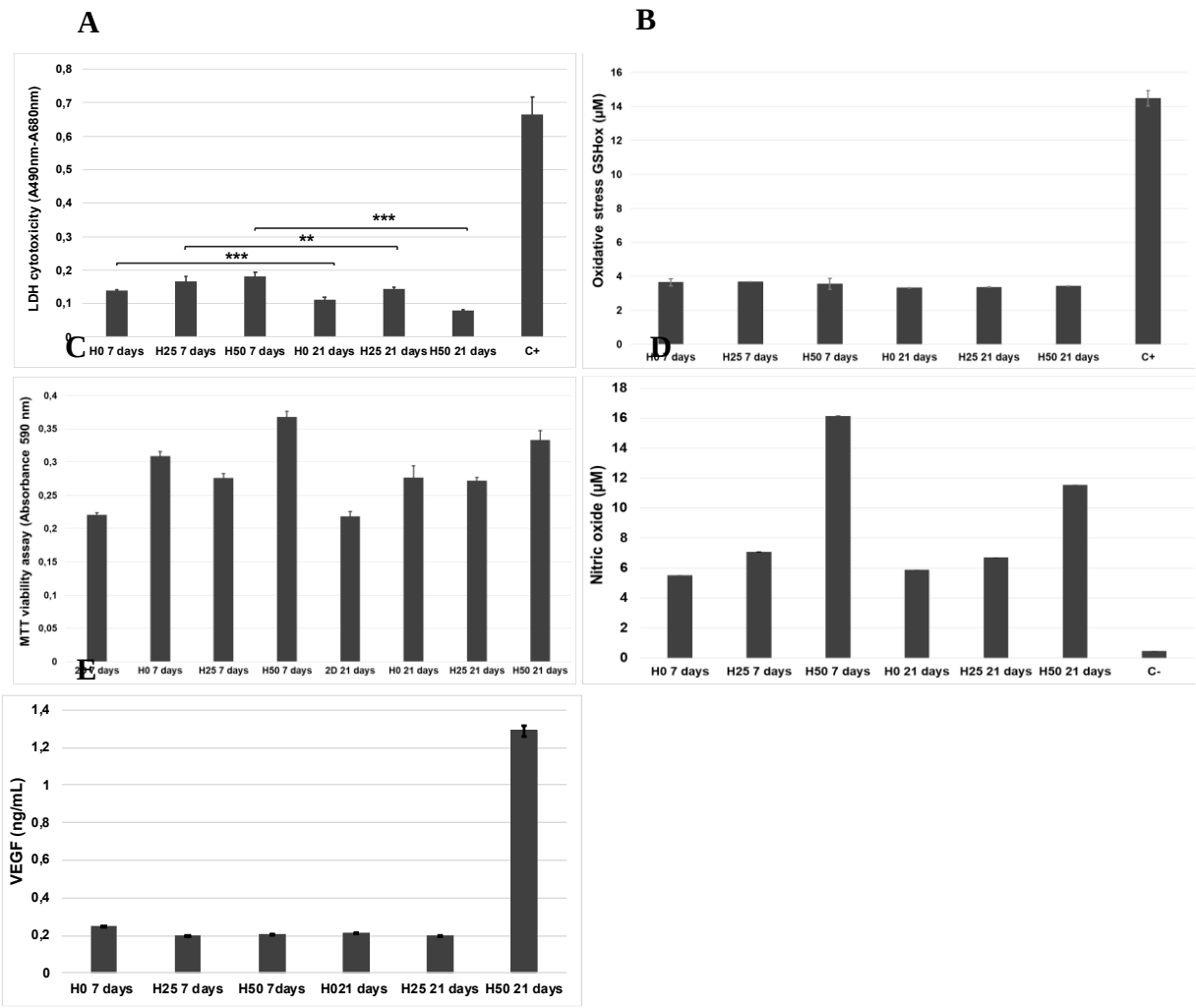


Figure 6. Characterization of blood vessel constructs populated with EPC and SMP. A. LDH viability assay, B. oxidative stress assays, C. MTT proliferation assay, D. Nitric oxide assay, E. ELISA assay for determination of VEGF

Characterization of blood vessel constructs populated with EPCs and SMPs was assessed using biochemical assays. EPC and SMP behavior at 7 and 21 days after bioprinting was evaluated using LDH, GSH, and MTT assays, as well as and SEM. Cellular viability after 7 days and 21 days was evaluated using an LDH assay. The results showed a low level of LDH compare to control suggesting that the cells remain viable in the constructs. At 7 days the highest level of LDH was observed for H50 construct, and after 25 days becoming the lowest (Fig. 6A). Cellular stress was evaluated using GSH assay. The level of GSH was between 3.33-3.69 µM, not statistical

significative compare with the positive control, suggesting that cells are not subjected to oxidative stress (Fig. 6B). The proliferation of the EPC and SPC was evaluated MTT assay. At 7 days post cultivation compare to the number of cells cultivated in plate (2D system), the cells in the H50 constructs presents a greater proliferation, followed by the cells in the H0 and H25 constructs. After 21 days the greatest proliferation was observed in H50 constructs, followed by H0 and H25 constructs (Fig. 6C). The level of nitric oxide (NO) was measured spectrophotometrically at 548 nm using the Griess Reagent Kit. The highest levels of NO were detected in H50 constructs, at 7 and 21 days, being 16,15 µM and 11,54 µM respectively (Fig. 6D). In H25 constructs the levels of NO were 7,8 µM and 6,7 µM at 7 days and 21 days of cultivation. The levels of NO do not change very much at 7 days and 21 day respectively for H0 constructs, being between 5,5-5,8 µM (Fig. 6D). The secretion of VEGF-A from the endothelial progenitor cells at 7 days and 21 days in culture was measured using VEGF-A ELISA kit. The highest level of VEGF-A was observed in H50 constructs, with a value of 1,29 ng/ml, followed by 0,25 ng/ml for H0 construct, and 0,25 ng/ml for H25 constructs (Fig. 6E). The results suggest that the cells are viable, with an active metabolism, and committed to EPC and SPC, being capable to secrete NO and VEGF.

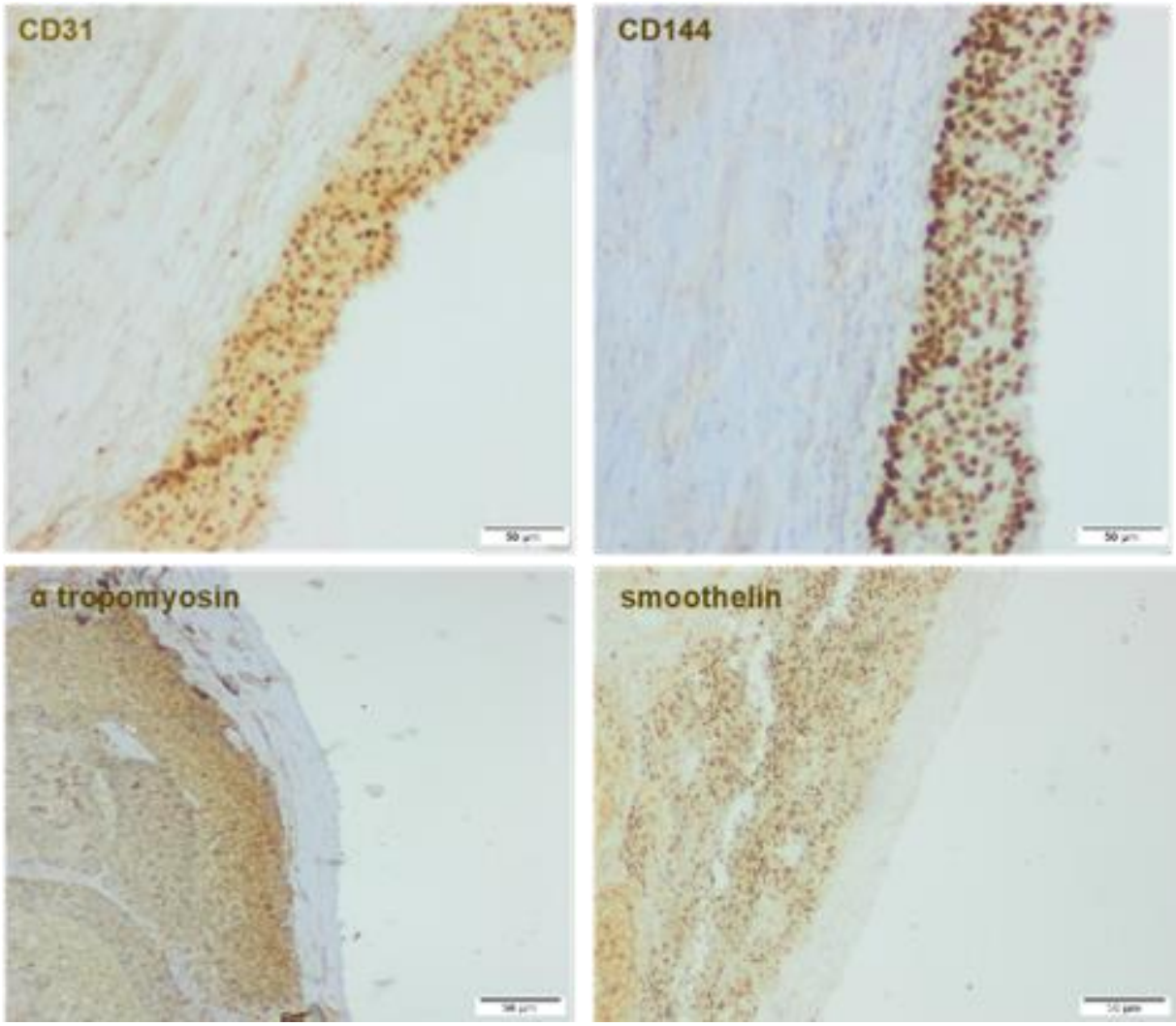


Figure 7. Immunohistochemistry of the constructs populated with EPC and SPC after 21 day in culture.

Immunohistochemistry was performed on 5μm-thick cryosections on constructs at 21 days post-bioprinting. The sections were then incubated overnight, at 4°C, with the following primary antibodies CD31, CD144, smoothelin, tropomyosin. The results showed that the cells expressed these endothelial and smooth muscle markers. Furthermore, immunohistochemistry images showed that the cells growth as they were bioprinted, observing the difference between external (muscle) layers, stained positive for tropomyosin and smoothelin and internal (endothelial) layers, stained positive for CD31 and CD144 (Fig. 7).

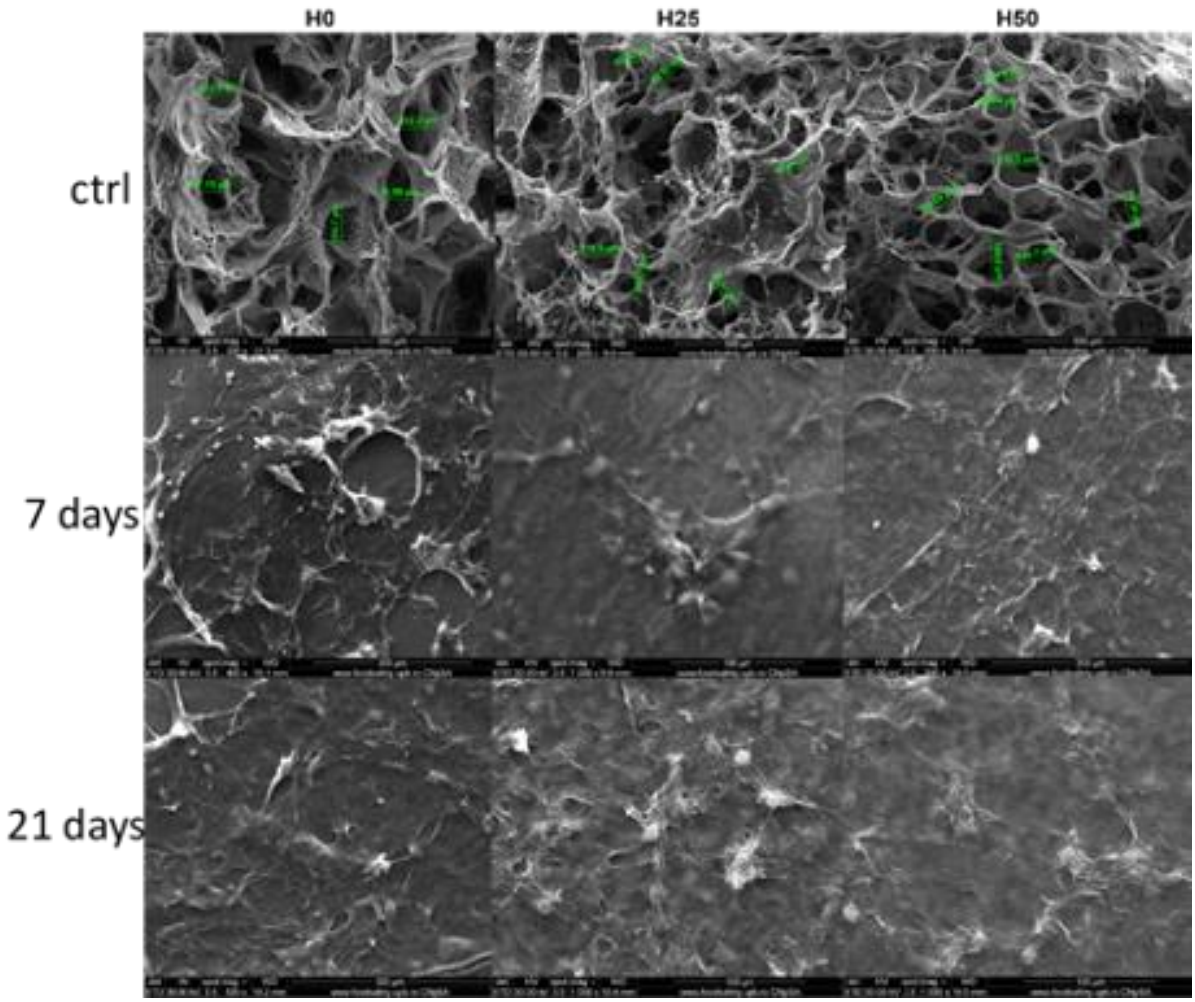


Fig. 8 Scanning electron microscopy images of H0, H25 and H50 hydrogels populated with EPC and SPC at 7 days and 21 days

The results showed that the cells adhere and distribute evenly in the collagen and hyaluronic acid hydrogels, which demonstrates the biocompatibility of these hydrogels. The H0 hydrogel has a porous structure, forms large pores with a diameter between 80-150 µM, H25 has smaller pores, between 40-120 µM and H50 between 80-150 µM. In the presence of the H0 hydrogel, the cells have a fusiform morphology and emit filopods that allow the cells to interact with each other and with the collagen fibres. The H25 and H50 hydrogels allow a good growth of cells, forming a rich extracellular matrix which allows a good adhesion and the possibility of organizing in a tissue (Fig. 8).

In conclusion, these results showed that the collagen/hyaluronic acid hydrogels allows the creation of the vascular constructs; the parameters of the 3D bioprinter have been optimized so that a vascular structure similar to the model developed in the BIOCAD program can be created. Amniotic fluid isolated cells are mesenchymal stem cells with potential for differentiation to endothelial and smooth muscle cells. The collagen-hyaluronic acid hydrogels are biocompatibile with the EPC and SPC. The obtained results showed that in the vascular structures created the cells are viable, proliferate and secrete factors necessary for the formation of blood vessels. The cells in the vascular structures express markers specific to the endothelial and muscular cells, suggesting the possibility of vascular graft formation.

References

1. Thomas J.D. Could 3D bioprinted tissues offer future hope for microtia treatment. International Journal of Surgery, 32, 43-44, 2016

2. Iordache, F., 2019. Hydrogels and Polymer-based Scaffolds, Chapter 2: Bioprinted scaffolds. Elsevier Academic Press, USA.

3. Chua C.K., Yeong W.Y. Bioprinting: Principles and Applications. Singapore: World Scientific Publishing Co., 2015.

4. Datta P, Ayan B, Ozbolat IT. Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication. Acta Biomaterialia 51, 1–20, 2017.

5. Abdulrazzak H, De Coppi P, Guillot PV. Therapeutic potential of amniotic fluid stem cells. Curr Stem Cell Res Ther. 8(2):117-24, 2013.

6. Pozzobon M, Piccoli M, Schiavo AA, Atala A, De Coppi P. Isolation of c-Kit+ human amniotic fluid stem cells from second trimester. Methods Mol Biol. 1035:191-8, 2013.

7. Pipino C, Pierdomenico L, Di Tomo P, Di Giuseppe F, Cianci E, D'Alimonte I, Morabito C, Centurione L, Antonucci I, Mariggiò MA, Di Pietro R, Ciccarelli R, Marchisio M, Romano M, Angelucci S, Pandolfi A. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid-derived cells: a morphological and proteomic approach. Stem Cells Dev. 24(12):1415-28, 2015.

8. Cananzi M, De Coppi P. CD117+ amniotic fluid stem cells: State of the art and future perspectives. Organogenesis 8:3, 77-88, 2012.

9. Benavides OM, Quinn JP, Pok S, Petsche Connell J, Ruano R, Jacot JG. Capillary-Like Network Formation by Human Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Within Fibrin/Poly(Ethylene Glycol) Hydrogels. Tissue Eng Part A. 21(7-8):1185-94, 2014.

10. Connell JP, Ruano R, Jacot JG. Amniotic fluid-derived stem cells demonstrate limited cardiac differentiation following small molecule-based modulation of Wnt signaling pathway. Biomed Mater. 10(3):034103, 2015.

11. Resca E, Zavatti M, Maraldi T, Bertoni L, Beretti F, Guida M, La Sala GB, Guillot PV, David AL, Sebire NJ, De Pol A, De Coppi P. Enrichment in c-Kit improved differentiation potential of amniotic membrane progenitor/stem cells. Placenta. 36(1):18-26, 2015.

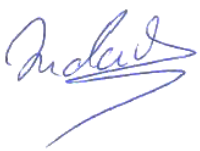
12. Spinelli V, Guillot V.P., De Coppi P. Induced pluripotent stem (iPS) cells from human fetal stem cells (hFSCs). Organogenesis, 9(2):101–110, 2013.

13. Mirabella T, Hartinger J, Lorandi C, Gentili C, van Griensven M, Cancedda R. Proangiogenic soluble factors from amniotic fluid stem cells mediate the recruitment of endothelial progenitors in a model of ischemic fasciocutaneous flap. Stem Cells Dev., 21(12):2179-2188, 2012.
14. D. Mozaffarian, E. J. Benjamin, A. S. Go, D. K. Arnett, M. J. Blaha, M. Cushman, S. R. Das, S. de Ferranti, J. P. Despres, and H. J. Fullerton, Circulation 133(4), e38 (2016).
15. J. D. Lee, M. Srivastava, and J. Bonatti, Circ. J. 76(9), 2058 (2012)
16. B. C. Isenberg, C. Williams, and R. T. Tranquillo, Circ. Res. 98(1), 25 (2006).
17. L. Dall'Olmo, I. Zanusso, R. Di Liddo, T. Chioato, T. Bertalot, E. Guidi, and M. T. Conconi, Biomed. Res. Int. 2014, 685426
18. A. Hasan, A. Memic, N. Annabi, M. Hossain, A. Paul, M. R. Dokmeci, F. Dehghani, and A. Khademhosseini, Acta. Biomater. 10(1), 11 (2014).
19. Z. H. Syedain, M. L. Graham, T. B. Dunn, T. O'Brien, S. L. Johnson, R. J. Schumacher, and R. T. Tranquillo, Sci. Trans. Med. 9(414), eaan4209 (2017).
20. D. G. Seifu, A. Purnama, K. Mequanint, and D. Mantovani, Nat. Rev. Cardiol. 10(7), 41, 2013.
21. J. Jang, J. Y. Park, G. Gao, and D.-W. Cho, Biomaterials, 156, 88 (2018).
22. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels în vascular smooth muscle. Nature. 1994; 368:850–853.
23. Y. Zhang, Y. Yu, H. Chen, I.T. Ozbolat, Characterization of printable cellular micro-fluidic channels for tissue engineering, Biofabrication 5 (2013) 025004.
24. Jia W, Gungor-Ozkerim PS, Zhang YS, Yue K, Zhu K, Liu W, Pi Q, Byambaa B, Dokmeci MR, Shin SR, Khademhosseini A. Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. Biomaterials. 2016 Nov;106:58-68.
25. Katia Jarquín-Yáñez, Jesús Arenas-Alatorre, Gabriela Piñón-Zárate, Rosa María Arellano-Olivares1, Miguel Herrera-Enríquez, Beatriz Hernández-Téllez, Andrés E Castell-Rodríguez. Structural Effect of Different EDC Crosslinker Concentration in Gelatin- Hyaluronic Acid Scaffolds. J Bioengineer & Biomedical Sci.6:2, 1-6, 2016.

30.10.2020

Project director,

Dr. Florin Iordache



Scientific Report (December 2019 - October 2020)

Project PN-III-P1-1.1-PD-2016-1942

"Evaluation of the therapeutic potential of non-viral apolipoprotein E gene transfer to limit progression of atherosclerosis"

In the period December 2019 - October 2020, in the project PN-III-P1-1.1-PD-2016-1942 entitled: „Evaluation of the therapeutic potential of non-viral apolipoprotein E gene transfer to limit progression of atherosclerosis", the experiments planned in the activity A3.1: „Evaluation of atherosclerotic plaques after systemic administration of apoE polyplexes in apoE-deficient mice" were performed.

Apolipoprotein E (apoE) has anti-atherosclerotic properties (facilitates the cellular cholesterol efflux) as well as anti-inflammatory and antioxidant properties. The majority of plasma apoE comes from the liver, but apoE is also synthesized by macrophages, spleen, lungs, kidneys, muscles and brain. The biological activity of apoE may be influenced by changes in its structure or quantity. A structural alteration is generated by the polymorphism of the APOE gene located on the long arm of chromosome 19, being described three alleles (ε2, ε3 şi ε4) encoding three isoforms: E2, E3, and E4, which differ in the amino acids present at positions 112 and 158. The frequency of the three alleles in the Caucasian population varies as follows: ε2 = 8-12%, ε3 = 74-78%, ε4 = 14-15%. E3 isoform is associated with normal lipid metabolism. ApoE2 has a low affinity for the LDL receptor, which leads to higher plasma levels of apoE, and in response, the liver increases the expression of LDL receptors resulting in lower cholesterol levels. Unlike apoE2, apoE4 has a more effective "clearance", which leads to lower plasma levels of apoE and higher cholesterol levels. In addition, apoE4 has been associated with Alzheimer's disease. ApoE deficiency is associated with atherosclerosis in both humans and mice. Systemic overexpression of apoE in mice induces hypertriglyceridemia, indicating that an optimal level of apoE protein in plasma is required for proper cholesterol removal.

In this project, we administered C60PEI-apoE3 polyplexes to atherosclerotic mice as a therapeutic agent to reduce the atherosclerotic process. In the first stage of the project, we obtained transfection agents based on C60-PEI polyplexes with apoE3 encoding DNA. Using molecular cloning methodology, we obtained five constructs containing apoE3 encoding DNA (the total sequence or several apoE fragments cloned into the pcDNA3.1-DYK vector) required for *in vivo* transfection. In the second stage of the project, the functionality of C60-PEI-apoE3 nanoparticles as *in vivo* transfection agents was tested after injections of mice with C60-PEI polyplexes and apoE3 encoding DNA. In the third stage of the project, atherosclerotic plaques were evaluated after systemic administration of C60-PEI-apoE polyplexes to apoE-deficient mice. ApoE-deficient mice were treated with a hypercholesterolemic diet throughout the period of administration of C60-PEI-apoE polyplexes. The amount of apoE protein in the serum of apoE-deficient mice treated with polyplexes was determined using the "Human ApoE ELISA development kit". For the "en face" evaluation of the atherosclerotic plaques, the mice's aorta were fixed with 4% PFA and stained with Oil Red O. To avoid using an excess of C60-PEI *in vivo*, the formation of polyplexes was optimized using DNA sequences encoding three fluorescent proteins (A7TagBFP, A8Cerulean or B7PA-GFP cloned in SalI and Eco47III sites of pEYFPC1 vector).

Publications:

- *The Opposite Effect of c-Jun Transcription Factor on Apolipoprotein E Gene Regulation in Hepatocytes and Macrophages,* Violeta G. Trusca, Elena V. Fuior, Dimitris Kardassis, Maya Simionescu, Anca V. Gafencu*, Int J Mol Sci. 2019 Mar 23;20(6):1471, PMID: 30909560*
- *The Mechanism of Bisphenol A Atherogenicity Involves Apolipoprotein A-I Downregulation through NF-κB Activation,* Violeta G. Trusca, Madalina Dumitrescu, Ioana M. Fenyo, Irina F. Tudorache, Maya Simionescu, Anca V. Gafencu*, Int J Mol Sci. 2019 Dec 12;20(24):6281, PMID: 31842455*
- *Manuscript in preparation: Fullerene-based nanoparticles conjugated with apolipoprotein E encoding DNA used in the anti-atherosclerosis therapy,* Violeta G. Trusca, Ioana M. Fenyo, Mădălina Dumitrescu, Cristina Uritu, Mariana Pinteala, Anca V. Gafencu.

RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL - 2022

Titlul proiectului: Conceperea și sinteza unor compuși noi ai vanadiului pentru terapia diabetului; evaluarea preclinică într-un model experimental de diabet (DIAVAN)
Contract PN-III-P1-1.1-PD-2019-0247
Nr. PD 18/2020 (01.09.2020 – 31.08.2022)

Scopul proiectului **DIAVAN** este de a proiecta și sintetiza noi compuși pe bază de vanadiu ca medicamente insulino-mimetice și anti-diabetice potente.

Obiectivele proiectului **DIAVAN** sunt:

(OB 1) *Proiectarea, sinteza și caracterizarea de noi compuși ai vanadiului cu bază Schiff derivată de la aminoacizi;*

(OB 2) *Evaluarea potențialului noilor compuși ai vanadiului de a inversa rezistența la insulină indusă în hepatocite umane în cultură;*

(OB 3) *Studiul efectelor anti-diabetice ale noilor compuși ai vanadiului într-un model preclinic de șoarece cu diabet de tip 2 și rezistență la insulină.*

Indicatori de realizare: În cadrul proiectului DIAVAN au fost îndepliniți toți indicatorii de realizare propuși, astfel:

- Pentru **OB 1**, care a fost implementat în **etapa 1 (septembrie – decembrie 2020)** a proiectului, au fost sintetizate 3 noi combinații complexe ale vanadiului prin coordinarea bazei Schiff derivate de la aminoacidul valină și diferiți derivați de benzaldehidă (*o*-vanilină, salicilaldehidă) la centrii de vanadiu. Compușii au fost caracterizați fizico-chimic prin metode cristalografice și spectroscopice și li s-a determinat capacitatea de a se lega de proteinele serice și stabilitatea în medii biologice.
- Pentru **OB 2**, implementat în **etapa 2 (ianuarie – decembrie 2021)**, s-a evaluat toxicitatea noilor compuși ai vanadiului asupra liniei de hepatocite umane (HepG2) în cultură și efectul lor terapeutic. Doi dintre noii compuși dezvoltați prezintă activitate insulino-mimetică și de reversare a rezistenței la insulină. Aceste proprietăți au fost evidențiate prin cuantificarea moleculelor implicate în semnalizarea insulinei, glicoliză și metabolismul lipidic, folosind tehnici imunologice și colorimetrice.
- Pentru **OB 3**, implementat în **etapa 3 (ianuarie – august 2022)**, s-a determinat *in vivo* activitatea anti-diabetică a celui mai potent insulino-mimetic, stabilit în OB 2, prin utilizarea modelului de șoarece cu diabet de tip 2 și rezistență la insulină (IR-T2DM). Pentru aceasta s-au măsurat nivelurile de glucoză, insulină, lipide, markeri hepatici și renali din sânge și/sau urină și conținutul de lipide din ficat, folosind tehnici imunologice, colorimetrice și de microscopie.
- Diseminarea rezultatelor s-a făcut prin pagina web a proiectului (http://www.icbp.ro/static/en/en-networking_grants-grants-national_grants/diavan.html), prin publicarea, în calitate de prim-autor, a trei lucrări în reviste indexate ISI (factor de impact mai mare de 4.76) și prin prezentarea sub formă de postere la 4 conferințe internaționale/naționale.

Rezultatele obținute în proiectul DIAVAN și impactul estimat:

În cadrul proiectului DIAVAN au fost sintetizate și caracterizate structural și spectral 3 noi combinații complexe ale oxidovanadiului(V) cu baze Schiff provenite de la aminoacidul valină (val) și derivați ai benzaldehidei (salicilaldehidă = sal și *o*-vanilină = van); [{$V^{V}O$(R-salval)(H_2O)}(μ_2-O){$V^{V}O$(R-salval)}] (**1a**), [{$V^{V}O$(R-vanval)(CH_3OH)}$_2$(μ_2-O)] (**2a**) și [$V^{V}O$(vanval)(CH_3O)]$_4$ (**3a**).

Experimentele realizate *in vitro* au reliefat următoarele:

(1) cele 3 combinații complexe nou sintetizate sunt stabile în mediile biologice și au o capacitate crescută de legare la albumina serică bovină;

(2) combinațiile complexe dinucleare ale oxidovanadiului(V) (**1a**, **2a**) sunt citocompatibile cu hepatocitele din linia HepG2 la concentrații de aproximativ 100 µM, pe când compusul tetranuclear (**3a**) este citotoxic având un $IC_{50} \approx 6$ µM;

(3) la concentrațiile non-citotoxice, combinațiile complexe dinucleare **1a**, **2a** prezintă efecte insulino-mimetice, evidențiate prin reducerea activității totale a PTP și creșterea fosforilării INS R, AKT și ERK în celulele HepG2;

(4) insulino-mimeticul **2a** crește răspunsul celulelor HepG2 rezistente la insulină (IR) la acțiunea hormonului insulină față de compusul **1a** sau medicamentul anti-diabetic metformină, evidențiat prin: creșterea preluării glucozei, amplificarea sintezei glicogenului și reducerea nivelurilor de lipide (trigliceride și colesterol) acumulate în celule;

(5) mecanismul prin care compusul **2a** reversează IR în celulele HepG2 implică: inhibarea expresiei PTP-1B, fosforilarea/ activarea INS R și a mesagerilor secundari precum AKT, ERK, diminuarea nivelurilor proteinelor implicate în homeostazia glucozei (G-6-Pase), metabolismul glicogenului (GSK3) și sinteza lipidelor (FAS și HMGCR) și prin creșterea nivelurilor GLUT4.

Studiile preclinice, care au utilizat șoarecii C57BL/6j, au arătat următoarele:

(1) insulino-mimeticul **2a** nu induce toxicitate șoarecilor la dozele testate (3.75, 7.5 și 15 mg/Kg corp șoarece);

(2) 2a este rapid preluat de către țesuturi și organe, cu precădere de rinichi și ficat;

(3) 2a are efecte anti-diabetice și de reversare a rezistenței la insulină, evidențiate pe modelul de șoarece cu diabet de tip 2 si rezistență la insulină, prin: reducerea nivelurilor de glucoză circulantă și excretată, normalizarea indicelui HOMA-IR, îmbunătățirea nivelurilor markerilor hepatici si renali, scăderea nivelurilor de lipide circulante și acumulate la nivel hepatic, depozitarea glucozei sub forma de glicogen și reducerea fibrozei hepatice induse de diabet.

Acest proiect inovator combină sinteza de noi compuși ai vanadiului și investigarea preclinică a potențialului lor anti-diabetic, pentru a dezvolta o nouă strategie terapeutică pentru tratamentul T2DM.

Diseminare rezultate

Publicații în reviste ISI

1. **Turtoi M**, Anghelache M, Patrascu AA, Deleanu M, Voicu G, Raduca M, Safciuc F, Manduteanu I, Calin M, Popescu D-L. Antitumor Properties of a New Macrocyclic Tetranuclear Oxidovanadium(V) Complex with 3-Methoxysalicylidenvaline Ligand. Biomedicines. 2022; 10(6):1217. https://doi.org/10.3390/biomedicines10061217. **IF 4,757**.

2. **Turtoi M**, Anghelache M, Patrascu AA, Maxim C, Manduteanu I, Calin M, Popescu DL. Synthesis, Characterization, and In Vitro Insulin-Mimetic Activity Evaluation of Valine Schiff Base Coordination Compounds of Oxidovanadium(V). Biomedicines 2021; 9(5):562. doi:10.3390/biomedicines9050562. **IF 4,757**.

3. **Turtoi M**, Anghelache M, Bucatariu SM, Deleanu M, Voicu G, Safciuc F, Manduteanu I, Fundueanu G, Simionescu M, Calin M. A novel platform for drug testing: Biomimetic three-dimensional hyaluronic acid-based scaffold seeded with human hepatocarcinoma cells. Int J Biol Macromol. 2021; 185:604-619. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.174. **IF 8,025**.

Participări la conferințe internaționale/ naționale - Postere

1. **Turtoi M**, Anghelache M, Deleanu M, Voicu G, Safciuc F, Patrascu A-A, Popescu D-L, Calin M. Designing and antitumor activity of a new vanadium-based compound. A 19-a Conferință Internațională de Nanoștiințe și Nanotehnologii (NN22), 5-8 iulie 2022, Salonic, Grecia (participare online).

2. **Turtoi M**, Anghelache M, Patrascu A-A, Maxim C, Popescu D-L, Manduteanu I, Calin M. Designing of New Biocompatible Coordinating Compounds of Oxidovanadium(V) As Insulin Mimetics. A 18-a Conferință Internațională de Nanoștiințe și Nanotehnologii (NN21), 6-9 iulie 2021, Salonic, Grecia.

3. **Turtoi M**, Anghelache M, Popescu D-L, Manduteanu I, Calin M. Design of new oxidovanadium(V) compounds as insulin-mimetics. Al 42-lea Simpozion Aniversar al Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu" și a 37-a Sesiune Științifică Anuală a Societății Române de Biologie Celulară, 4-6 noiembrie 2021 (sesiune online).

4. Petcuța O, Bordeiașu M, Madalan A.M, **Cărnuță (Turtoi) M**, Popescu D-L. Synthesis and characterization of new dinuclear oxovanadium(V) compounds. A 3-a Conferință Internațională privind Tehnologiile Emergente în Ingineria Materialelor (EMERGEMAT), 29-30 octombrie 2020, București, România.

CONCEPEREA ȘI SINTEZA UNOR COMPUȘI NOI AI VANADIULUI PENTRU TERAPIA DIABETULUI; EVALUAREA PRECLINICĂ ÎNTR-UN MODEL EXPERIMENTAL DE DIABET [DIAVAN]

ETAPA 1 (01.09.2020 – 31.12.2020)

Dezvoltarea de noi compuși ai vanadiului derivați de la aminoacizi

Etapa 1 a proiectului DIAVAN își propune sinteza și caracterizarea fizico-chimică de noi compuși ai vanadiului cu baze Schiff derivate de la aminoacidul valină și derivați de benzaldehidă, precum salicilaldehidă și *o*-vanilină și evaluarea *in vitro* a solubilității/stabilității acestor compuși în soluții (în condiții fiziologice) și a capacității lor de legare la proteinele plasmatice.

Indicatorii de realizare a obiectivului corespunzător etapei 1 au fost îndepliniți în totalitate.

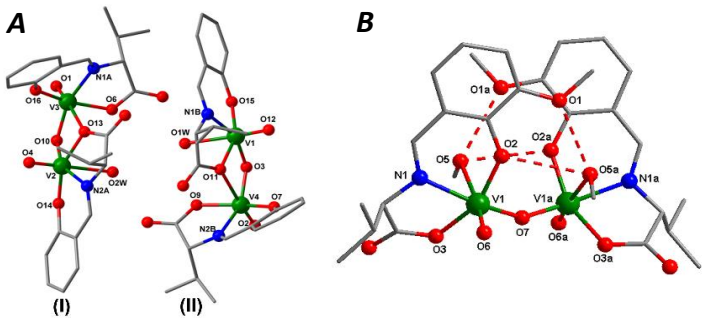
Rezultatele obținute în etapa 1 a proiectului DIAVAN sunt:

1) folosind o metodă simplă și eficientă, au fost sintetizați doi noi compuși ai vanadiului (V^V) și enantiomerii lor pornind de la sulfatul de vanadil, aminoacidul valină și salicilaldehidă/*o*-vanilină;

2) compușii de vanadiu sintetizați au fost caracterizați structural prin difracție de raze X pe monocristal și spectral prin spectroscopie optică (UV-Vis, FT-IR și dicroism circular). Datele structurale și spectrale au evidențiat că cei 4 compuși sunt dinucleari (V^V), având o geometrie octaedrică distorsionată. Aceștia sunt stabili din punct de vedere structural ca rezultat al stabilirii unor cicluri chelate de 5 atomi între ligandul de tip bază Schiff și centrii de vanadiu și mai mult ca rezultat al formării punților de hidrogen intra-/intermoleculare;

3) solubilitatea și stabilitatea compușilor de vanadiu(V) au fost estimate *in vitro* și datele obținute au evidențiat că aceștia prezintă solubilitate crescută în solvenți nepolari, precum DMSO și metanol și stabilitate moderat-crescută în condiții fiziologice;

4) combinațiile complexe ale vanadiului(V), sintetizate până în prezent, se leagă la proteinele plasmatice (albumină).



*(**A**) Unitatea asimetrică a compusului [{VO(R-salval)(H₂O)}(μ₂-O){VO(R-salval)}]. Moleculele independente sunt denumite I și II.*
*(**B**) Structura moleculară a compusului [{VO(R-vanval)(CH₃OH)}₂(μ₂-O)]. Salval = N-salicilidenvalină, vanval = 3-metoxi-N-salicilidenvalină.*

Diseminare:

Participări la conferințe internaționale/naționale – Postere

Petcuţă O, Bordeiaşu M, Mădalan A.M, Cărnuță M, Popescu D.L. Synthesis and characterization of new dinuclear oxovanadium(V) compounds. A 3-a Conferință Internațională ”Tehnologii Emergente în Ingineria Materialelor – EMERGEMAT”, 29-30 octombrie 2020, București, România.

CONCEPEREA ȘI SINTEZA UNOR COMPUȘI NOI AI VANADIULUI PENTRU TERAPIA DIABETULUI; EVALUAREA PRECLINICĂ ÎNTR-UN MODEL EXPERIMENTAL DE DIABET [DIAVAN]

ETAPA 2 (01.01.2021 – 31.12.2021)

Evaluarea *in vitro* a proprietăților insulino-mimetice și de reversare a rezistenței la insulină a compușilor vanadiului nou sintetizați

Etapa 2 a proiectului DIAVAN își propune să evidențieze proprietățile insulino-mimetice ale compușilor vanadiului nou sintetizați și să evalueze *in vitro* efectul tratamentului cu insulino-mimeticul cel mai potent asupra rezistenței la insulină (IR). IR a fost indusă în hepatocitele din linia de carcinom hepatic uman (HepG2) prin expunerea lor la niveluri crescute de insulină/glucoză și a fost estimată prin urmărirea moleculelor cheie implicate în calea de semnalizare a insulinei, în glicoliză și metabolismul lipidic.

Indicatorii de realizare a obiectivului corespunzător etapei 2 au fost îndepliniți în totalitate.

Rezultatele etapei 2 a proiectului DIAVAN sunt:

1. combinațiile complexe di/tetranucleare ale oxidovanadiului(V) sintetizate în proiectul DIAVAN, dintre care trei nou dezvoltate, au o capacitate crescută de legare la albumina serică bovină;

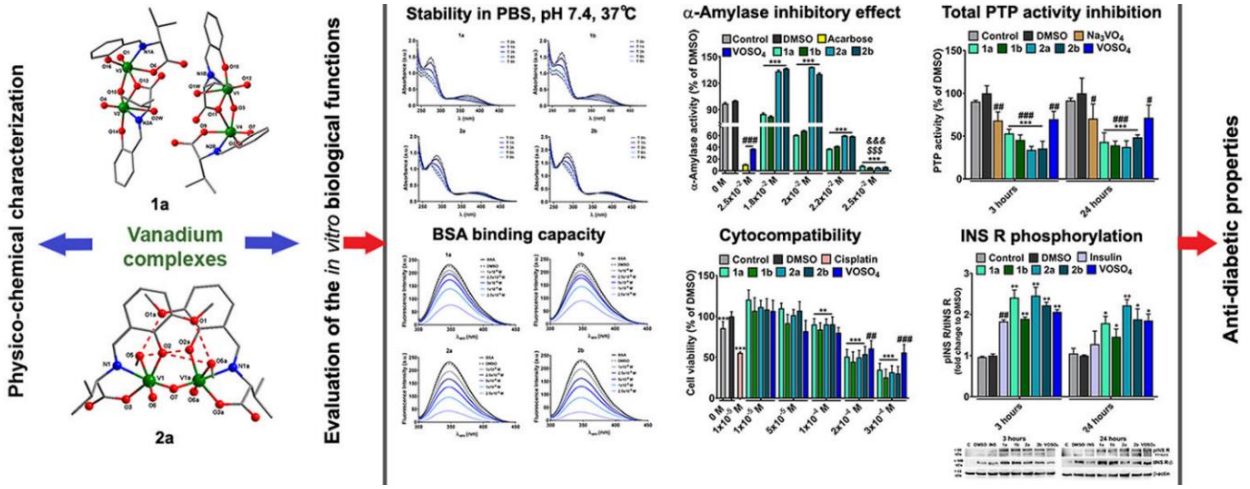
2. combinațiile complexe dinucleare ale oxidovanadiului(V) sunt citocompatibile la concentrații de aproximativ 100 µM;

3. la concentrațiile non-citotoxice, combinațiile complexe dinucleare prezintă efecte insulino-mimetice, evidențiate prin reducerea activității totale a protein tirozin fosfatazelor (PTP) și creșterea fosforilării receptorului pentru insulină (INS R), protein kinazei B (AKT) și protein kinazei reglate de semnalele extracelulare (ERK) în celulele HepG2;

4. modelul de IR *in vitro* a fost dezvoltat cu succes prin expunerea celulelor HepG2 la niveluri crescute de insulină;

5. compusul insulino-mimetic cel mai potent, ([{VO(R-van-val)(CH_3OH)}$_2$(μ_2-O)]), a favorizat creșterea răspunsului celulelor IR la hormonul insulină față de medicamentul anti-diabetic metformină, evidențiat prin: creșterea preluării glucozei, amplificarea sintezei glicogenului și reducerea nivelurilor de lipide (trigliceride și colesterol) acumulate în celule;

6. mecanismul prin care [{VO(R-van-val)(CH_3OH)}$_2$(μ_2-O)] reversează IR în celulele HepG2 implică: inhibarea expresiei PTP-1B, fosforilarea/activarea INS R și a mesagerilor secundari precum AKT, ERK, fosfoinozitol 3 kinaza (PI3K), diminuarea nivelurilor proteinelor implicate în homeostazia glucozei (glucoso-6-fosfataza, G-6-Pase), metabolismul glicogenului (kinaza sintazei glicogenului, GSK3) și sinteza lipidelor (sintaza acizilor grași, FAS; 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductaza, HMGCR) și creșterea nivelurilor proteinei transportoare a glucozei (GLUT)4.



Proprietățile anti-diabetice ale complexelor de oxidovanadiu(V) cu baze Schiff derivate de la aminoacidul valină (val) și derivați de benzaldehidă, precum salicilaldehidă (sal) și o-vanilină (van). *1a = [{VO(R-salval)(H_2O)}(μ_2-O){VO(R-salval)}], 1b = [{VO(S-salval)(H_2O)}(μ_2-O){VO(S-salval)}], 2a = [{VO(R-vanval)(CH_3OH)}$_2$(μ_2-O)], 2b = [{VO(S-vanval)(CH_3OH)}$_2$(μ_2-O)], salval = N-salicilidenvalină, vanval = 3-metoxi-N-salicilidenvalină.*

Diseminare:

<u>Publicații în reviste ISI</u>

1. Turtoi M, Anghelache M, Patrascu AA, et al. Synthesis, Characterization, and In Vitro Insulin-Mimetic Activity Evaluation of Valine Schiff Base Coordination Compounds of Oxidovanadium(V). Biomedicines. 2021; 9(5):562. doi:10.3390/biomedicines9050562. **IF 6,081**.

2. Turtoi M, Anghelache M, Bucatariu SM, Deleanu M, Voicu G, Safciuc F, Manduteanu I, Fundueanu G, Simionescu M, Calin M. A novel platform for drug testing: Biomimetic three-dimensional hyaluronic acid-based scaffold seeded with human hepatocarcinoma cells. Int J Biol Macromol. 2021; 185:604-619. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.174. **IF 6,953**.

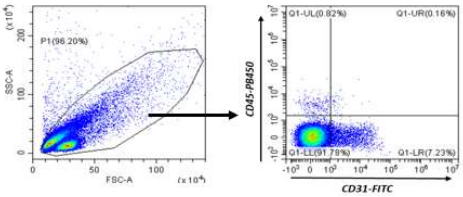
Participări la conferințe internaționale/ naționale - Postere

1. Turtoi M, Anghelache M, Patrascu A-A, Maxim C, Popescu D-L, Manduteanu I, Calin M. Designing of new biocompatible coordinating compounds of oxidovanadium(V) as insulin mimetics. A 18-a Conferință Internațională de Nanoștiințe și Nanotehnologii (NN21), 6-9 iulie 2021, Salonic, Grecia.

2. Turtoi M, Anghelache M, Popescu D-L, Manduteanu I, Calin M. Design of new oxidovanadium(V) compounds as insulin-mimetics. Al 42-lea Simpozion Aniversar al Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu" și a 37-a Sesiune Științifică Anuală a Societății Române de Biologie Celulară, 4-6 noiembrie 2021, sesiune online.

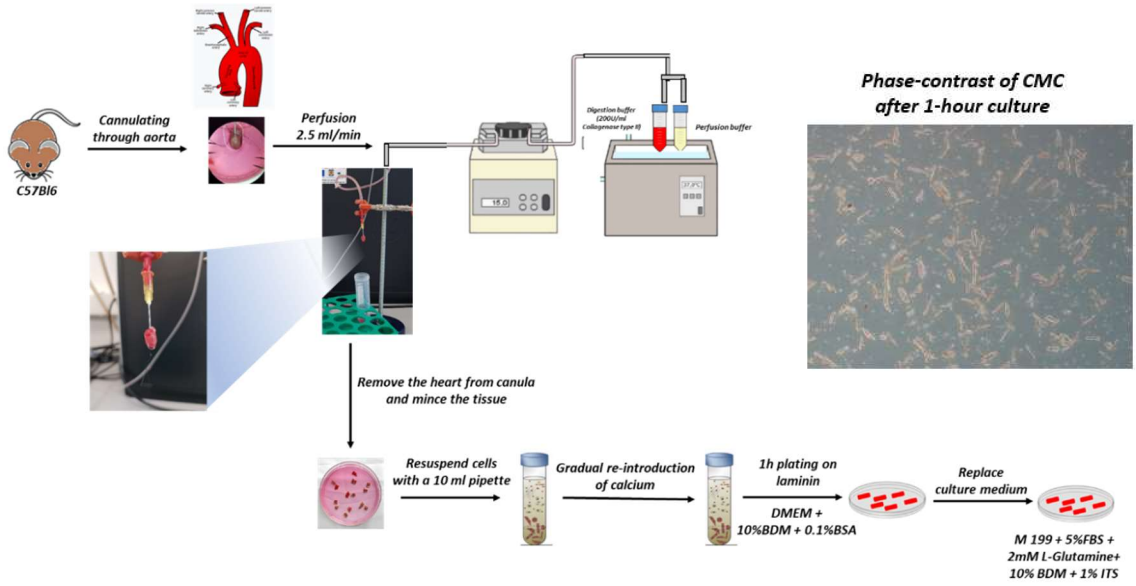
Raport decembrie 2017 - noiembrie 2018

➢ Celule endoteliale cardiace obtinute in cultura din soareci batrani

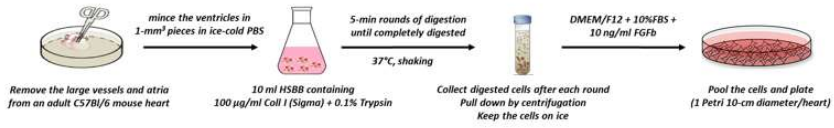


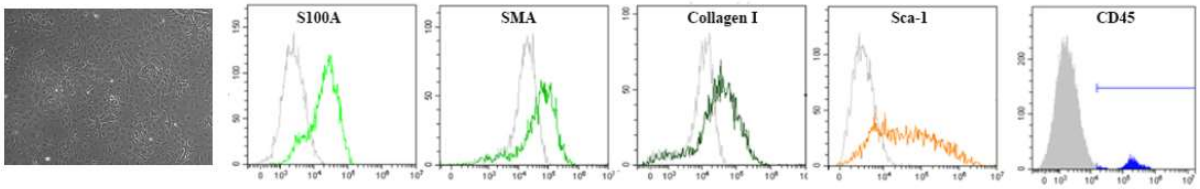
Endothelial cells (CD31+/CD45- cells) after digestion (before seeding): 4 - 25% of viable cells

➢ Purificarea in vitro a cardiomiocitelor adulte obtinute din soareci batrani



➢ Fibroblasti cardiaci obtinuti din soareci batrani





- **Diseminare**

  Lupan AM, Preda MB, Burlacu A. Standardization of a method for fluorescent labelling of mesenchymal stromal cells by lentiviral transduction. The 10th National Congress with International Participation and the 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology, Craiova, 6-9 June 2018.

  Burlacu A. Annual Progress report, "ERA-CVD 01KL1711-EXPERT Videoconference: Exploring new pathways in age-related diseases, organized by Hannover Medical School, June 20, 2018.

Regulamentul Programului
“Bursa Maya si Nicolae Simionescu”
Perioada desfășurării: 8 iunie 2022– 7 iunie 2030

Motto: « Cercetare biomedicală fundamentală și aplicativă în beneficiul sănătății omului ».

Art 1 – Introducere

1.1. Programul “Bursa Maya si Nicolae Simionescu” își propune să identifice și sa finanteze realizarea unui proiect de cercetare în domeniul științelor biomedicale.

1.2. Programul este organizat și desfășurat de către Societatea Română de Biologie Celulară (denumită în continuare „SRBC”) si Institutul de Biologie si Patologie Celulară N. Simionescu, cu sediul în București, strada Bogdan Petriceicu Hasdeu, nr. 8, sector 5, reprezentat de către dna. Maya Simionescu, în calitate de Director (denumit în continuare „IBPC” sau „Organizatorul”).

1.3. La ediția 2023 a programului va fi oferită o bursă in valoare de 10 000 euro pentru un proiect de cercetare original si valoros a unui cercetător pentru consolidarea carierei științifice.

Art. 2 – Condiții generale de eligibilitate

2.1. Acordarea Bursei are ca scop sprijinirea unui proiect de cercetare care va fi desfășurat de câștigătorul Bursei (numit in continuare „Bursier”) pentru o perioadă de 1 an, în cadrul unei entitati de cercetare dezvoltare (cum ar fi, dar fără a se limita la**:** universitate, institut de cercetare, unitati de cercetare din cadrul unor instituții medicale) din România.

2.2. La Program poate participa orice persoană fizică română care îndeplinește în mod cumulativ următoarele condiții la data limită pentru depunerea rezumatului aplicatiei (1 iunie 2023):

i) La data depunerii rezumatului, 1 iunie 2023, are o vârstă care nu depășește 40 de ani;

ii) A obținut titlul științific de doctor în domeniile biologie/biofizica/științele naturii/medicina, menționate în comunicat și desfășoară activitate de cercetare în unul dintre aceste domenii;

iii) Nu are antecedene penale sau nu este în cursul unor investigații penale;

2.3. La Program nu pot participa membrii juriului.

Art 3 - Definiție și mod de utilizare a bursei

3.1. Definiție

3.1.1. “Bursa Maya si Nicolae Simionescu” este anuală, și constă în acordarea sumei de 10 000 euro caștigătorului competiției.

3.1.2. Contravaloarea bursei este data direct câștigătorului competiției, în două tranșe egale: prima tranșă va fi virată în termen de 30 de zile de la data începerii de către câștigătorul Bursei a activității de cercetare susținută prin intermediul Programului. A doua tranșă va fi virată până la împlinirea a 6 luni de la începerea activității de cercetare.

3.1.3. Bursa poate fi combinată cu alte indemnizații: alte donații, salariu și finanțare pentru post-doctorat.

3.1.4. Castigatorul Bursei trebuie să înceapă activitatea de cercetare în cel mult o lună de la data semnării contractului de acordare a Bursei.

3.2. Utilizare

3.2.1. Bursele sunt destinate proiectului de cercetare și nu pot fi folosite pentru a procura echipamente de bază de laborator.

Câteva exemple de utilizare:

- Achiziționarea de substanțe, consumabile si materiale necesare implementării proiectului. Achizitionarea de echipamente informatice.
- Finanțare pentru participarea la conferințe, congrese, etc.
- Taxe de publicare.

3.3. Castigătorul Bursei va avea obligația să realizeze activitatea de cercetare propusa pe parcursul a 12 luni.

3.4. Organizatorul nu își asumă nicio răspundere decurgând din acordarea Bursei, inclusiv cu privire la plata oricăror daune sau a oricărei alte pretenții de orice natură în legătură cu Bursa. Câștigătorul Bursei își asumă întreaga răspundere pentru acceptarea Bursei.

3.5. În cazul în care Organizatorul constată că Bursierul nu a îndeplinit și/sau nu a respectat condițiile stipulate de prezentul Regulament, Organizatorul își rezervă dreptul de a anula oricând drepturile și beneficiile ce revin acestuia în calitate de câștigător al Bursei, fără ca Organizatorul să datoreze acestui vreo despăgubire. În caz contrar câștigătorul va avea obligația de a restitui Organizatorului valoarea Bursei în termen de cel mult 3 luni de la data solicitării Organizatorului.

3.6. În cazul în care câștigătorul Bursei dorește să întrerupă temporar activitatea de cercetare susținută prin intermediul Bursei, acesta trebuie să obțină acordul prealabil în scris al juriului Programului cu privire la respectiva întrerupere. În caz contrar, precum și în cazul întreruperii definitive a activității de cercetare susținută prin intermediul Bursei, bursierul este obligat să returneze contravaloarea sumei primite cu titlu de Bursa. Juriul Programului își rezervă dreptul de a verifica veridicitatea și autenticitatea informațiilor înscrise în dosarul de aplicare.

3.7. În cazul în care Bursierul întrerupe temporar activitatea de cercetare susținută prin intermediul Bursei, din motive neimputabile (spre ex. dar fără a se limita la incapacitate fizică), acesta trebuie sa anunțe juriul Programului cu privire la respectiva întrerupere, urmând a se hotărî împreuna cu juriul Programului, de comun acord, reluarea și perioada reluării activității.

3.8. Bursierul va notifica în prealabil președintele juriului în cazul în care intervin schimbări în activitatea de cercetare sau în cazul retragerii din proiect. După primirea notificării, juriul va decide pe marginea acestor schimbări.

Art. 4 – Procedura de înscriere

4.1. Persoanele care doresc să participe la Program trebuie să trimită la adresa bursa.simionescu@icbp.ro :

- Etapa I. Cel mai târziu până la data de 1 iunie 2023, ora 23.59 **rezumatul proiectului** cu o temă originală din domeniul cercetării biomedicale **si CV – Europass** in limba engleza, în format .pdf;
- Etapa II. Cei selectionati in prima etapa vor trimite până la data de 15 august 2023 ora 23.59, proiectul de cercetare in extenso, în format .pdf, însoțit de documentele care alcătuiesc dosarul de candidatură:

a) Consimțământ pentru prelucrarea datelor cu caracter personal;

b) Curriculum vitae în format Europass incluzand lista de lucrari, carti publicate în tară și străinatate;

c) Copie buletin de identitate/carte de identitate;

d) Aplicația de proiect completată în formatul pus la dispoziție pe site-ul competitiei. Proiectul de cercetare cu o temă originală din domeniul cercetării biomedicale – « Cercetare biomedicală fundamentală și aplicativă în beneficiul sănătății omului » ;

e) Acordul conducerii instituției de învățământ acreditate din România/instituției de profil din România unde își desfășoară activitatea, pentru implementarea proiectului de cercetare propus (cu semnătură și număr de înregistrare);

f) Recomandare din partea unui specialist in domeniul bursei solicitate;

g) Copii ale actelor de studii: diplome (licență, studii aprofundate, doctorat), alte certificate de specialitate/diplome;

h) Adeverință medicală, eliberată de medicul de familie, care atestă faptul că persoana este declarată aptă pentru efectuarea stagiului de bursă;

4.2. Aplicațiile incomplete sau înscrierile ulterioare datelor menționate în regulament nu vor fi luate în considerare.

Art 5 – Mod de desfasurare si criterii de selecție

5.1. Mod de desfasurare

Selectia proiectului de cercetare se va desfasura in doua etape; prima (pre-selectia) implica predarea rezumatului proiectului si a unui CV al candidatului (si este eliminatorie) iar in a doua etapa, proiectele selecționate vor fi prezentate *in extenso*.

Solicitantul trebuie:

Pentru Etapa I – pre-selectia

• Sa redacteze rezumatul proiectului de cercetare propus, în maximum 500 de cuvinte (text justificat, font Times New Roman 12 cu spațiu 1.15). Rezumatul trebuie sa conțină următoarele secțiuni: *Titlul, Introducere, Ipoteza, Obiectivele, Originalitatea, Metodologia, Rezultate anticipate*. Rezumatul va servi la pre-selectia celor mai merituoase proiecte pentru Etapa IIa.

• Să prezinte un CV in care sa specifice experiența academica (numărul, calitatea și impactul publicațiilor, prezentările la conferințe, brevete etc.)

Pentru etapa II a Competitiei: proiectul *in extenso:*

• Sa descrie proiectul de cercetare in extenso, conform formularului de aplicatie incluzand cunostintele actuale in domeniul propus, metodologia, noutatea, relevanța și impactul cercetării. Descrierea nu trebuie să depășească 7 pagini inclusiv rezumatul (1 pagina) si referințele (1 pagina).

• Activitatea de cercetare propusa trebuie să contribuie la dezvoltarea cunoașterii în domeniu.

5.1. Criteriile de selecție aplicate de juriu sunt descrise in detaliu in Anexa 1.

Art. 6 – Desemnarea câștigătorului

6.1. Aplicatiile candidații vor fi evaluate de un juriu independent format din cercetători de prestigiu. Grila de evaluare și procentele asociate fiecărui criteriu sunt prezentate în Anexa 1. Decizia juriului este definitivă și fără apel. Nu poate fi contestată sau supusă explicațiilor sau justificărilor.

6.2. Numele câștigătorului Bursei va fi comunicat personal, prin mass media și pe site-ul http://www.icbp.ro/static/en/en-education_training/bursa_maya_si_nicolae_simionescu_2023.html

6.3. Pentru acordarea Bursei, câștigătorul trebuie să se prezinte, în termenul și la adresa care îi vor fi comunicate de către Organizator, în vederea acceptării Bursei, prin semnarea contractului de acordare a Bursei.

Bursierul va avea obligația să respecte și să se conformeze tuturor prevederilor, termenilor și condițiilor reglementate prin contractul de acordare.

6.4. În cazul în care, din orice motive neimputabile Organizatorului, Bursierul nu va semna contractul de acordare a Bursei, în termenul comunicat de Organizator, acesta va pierde calitatea de câștigător al Bursei și toate drepturile care decurg din această calitate. În acest caz, Organizatorul va putea decide fie să nu mai acorde Bursa, fie să acorde Bursa unui alte Participant ce va fi desemnat de juriul Programului.

Art. 7 - Calendarul competiției

7.1. Programul este organizat și se desfășoară pe teritoriul României.

7.2. Programul pentru anul 2023 începe la data de 2 mai 2023 și se încheie la data de 1 mai 2024.

7.3. Calendarul Programului:

- Lansarea competiției: 2 mai, 2023
- Data de depunere rezumat însoțit de CV: 1 iunie, 2023
- Rezultate evaluare etapa I: 30 iunie, 2023
- Data de depunere a dosarului, incluzand proiectului de cercetare: 15 august, 2023
- Anunțarea caștigatoarei/caștigatorului : 5 octombrie, 2023
- Inceperea proiectului si a finanțarii: 16 octombrie, 2023
- Finalizare proiect : 15 octombrie 2024.

7.4. In termen de 30 de zile dupa finalizarea proiectului, bursierul trebuie să prezinte juriului Programului un raport de maxim 5 pagini cu rezultatele activității la adresa bursa.simionescu@icbp.ro. De asemeni, bursierul va face o prezentare a realizarilor obtinute, in cadrul congresului anual al SRBC „Omagiu Profesorului „Nicolae Simionescu".

7.5. Bursierul se anganjeaza sa citeze suportul financiar acordat de bursa in publicatiile ulterioare in stilul "this research was made possible in part by financial support from the "Maya and Nicolae Simionescu" research fellowship (Number/year)".

Art. 8 – Interzicerea înlocuirilor

8.1. În cadrul Programului nu este posibilă înlocuirea Bursei oferite cu contravaloarea acesteia în alte beneficii. De asemenea, nu se permite înlocuirea Bursierului cu o alta persoană care să beneficieze de aceasta.

Art. 9 – Taxe și impozite

9.1. Impozitele sau orice alte costuri de natură fiscală sau de altă natură ce ar putea fi datorate în legătură cu Bursa vor fi în sarcina Bursierului.

Art. 10 – Protecția datelor cu caracter personal

10.1. Organizatorul prelucrează datele cu caracter personal ale participanților pentru scopurile și în condițiile prezentate în Anexa 2.

Ar. 11 - Reguli

11.1 Participarea la Program implică acceptarea acestui Regulament.

Art. 12 – Încetarea înainte de termen a Programului

12.1. Programul poate înceta înainte de termen numai în cazul apariției unui eveniment ce constituie forță majoră sau a unui alt motiv neimputabil Organizatorului, care îl pune în imposibilitatea de a continua Programul. O asemenea încetare va avea loc numai după anunțarea în prealabil a publicului prin intermediul site-ului.

12.2. În situațiile avute în vedere la alin. 12.1, Organizatorul nu va avea nicio obligație sau răspundere, de niciun fel, față de Participanți, privind returnarea unor sume și/sau plata unor sume cu titlu de despăgubire.

Art. 13 – Litigiile și legea aplicabilă

13.1. Eventualele dispute apărute între Organizator și Participanți se vor rezolva pe cale amiabilă.

13.2. Legea aplicabilă Programului și dispozițiilor prezentului Regulament este legea română.

Art. 14 – Diverse

14.1. Regulamentul este disponibil oricărei persoane interesate prin afișarea, în permanență pe durata Programului, pe site-ul accesibil la adresa:

http://www.icbp.ro/static/en/en-education_training/bursa_maya_si_nicolae_simionescu_2023.html.

14.2. Organizatorul își rezervă dreptul de a modifica sau înlocui prezentul Regulamentul în orice moment pe parcursul derulării Programului. Orice modificare sau înlocuire a Regulamentului vor fi anunțate în prealabil, prin publicarea pe Site înainte de data intrării în vigoare a respectivei modificări/înlocuiri.

14.3. Eventualele reclamații legate de derularea Programului se vor putea trimite către Organizator în termen de maximum 2 (două) zile de la data la care a luat naștere situația contestată. După această dată Organizatorul nu va mai lua în considerație nicio reclamație.

14.4. Reclamațiile referitoare la premiul câștigat, ulterioare momentului acceptării și primirii premiului de către persoana câștigătoare, nu vor fi luate în considere de către Organizator.

14.5. Deciziile Organizatorului privind Programul sunt definitive și aplicabile tuturor Participanților.

14.6. Premiile neacordate indiferent de motiv vor rămâne în posesia Organizatorului care poate dispune liber de acestea în maniera pe care o va considera necesară sau potrivită intereselor sale.

14.7. Organizatorul este îndreptățit să ia toate măsurile necesare în caz de tentativă de fraudă a sistemului, abuz sau orice alte tentative care ar putea afecta imaginea sau costurile pe care le implică organizarea și desfășurarea Concursului.

ORGANIZATORI:

Societatea Romana de Biologie Celulara / Institutul de Biologie si Patologie Celulara “N. Simionescu”

Anexa I - Criterii de evaluare

Etapa I		
Criteriu	**Descriere**	**Procent**
Rezumatul proiectului	Relevanța subiectului; obiectivul, scopul și motivația sunt clare	70%
CV	Experiența academica (numărul, calitatea și impactul publicațiilor, prezentările la conferințe, brevete etc.	30%
Etapa II		
Criteriu	**Descriere**	**Procent**
Originalitatea proiectului	Ideea proiectului este originala si va produce rezultate care contribuie la avansarea cunoasterii.	10%
Proiectul de cercetare	Scopul cercetării, ipoteza de lucru și obiectivele sunt clar definite; Metodologia si activitatile sunt adecvate.Fezabilitatea proiectului.	40%
Importanța proiectului	Relația cu baza teoretică a cunoștințelor existente în domeniul de cercetare al proiectului; importanța subiectelor; impactul proiectului	10%
Eseu	Motivatia personala si stiintifica	10%
Contribuția științifică a aplicantului	Potențialul cercetătorului de a aduce o contribuție semnificativă în domeniul său sau pentru România. Numărul, calitatea și impactul lucrărilor publicate	30%

Anexa II

Consimțământul pentru prelucrarea datelor cu caracter personal
pentru candidații la bursa "Maya şi Nicolae Simionescu"

Subsemnatul/-a, _____, identificat/-ă prin B.I. / C.I. seria _____, nr. _____, eliberat/ă de _____, la data de _____, având C.N.P. _____, cu domiciliul stabil în localitatea _____, comuna _____, satul _____, str. _____, nr. _____, bl. _____, sc. _____, apt. _____,

în baza **Regulamentului U.E. nr. 679/2016**, *privind protecţia persoanelor fizice în ceea ce priveşte prelucrarea datelor cu caracter personal*, a **Legii nr. 129/2018** *pentru modificarea şi completarea Legii nr. 102/2005 privind înfiinţarea, organizarea şi funcţionarea Autorităţii Naţionale de Supraveghere a Prelucrării Datelor cu Caracter Personal, precum şi pentru abrogarea Legii nr. 677/2001 pentru protecţia persoanelor cu privire la prelucrarea datelor cu caracter personal şi libera circulaţie a acestor date*, a **O.U.G. nr. 41/2016** *privind stabilirea unor măsuri de simplificare la nivelul administraţiei publice centrale şi pentru modificarea şi completarea unor acte normative*, a **Legii nr. 190/2018** *privind măsuri de punere în aplicare a Regulamentului (UE) 2016/679 al Parlamentului European şi al Consiliului din 27 aprilie 2016 privind protecţia persoanelor fizice în ceea ce priveşte prelucrarea datelor cu caracter personal şi privind libera circulaţie a acestor date şi de abrogare a Directivei 95/46/CE (Regulamentul general privind protecţia datelor)*, referitor la:

1. Furnizarea către Societatea Română de Biologie Celulară a datelor mele cu caracter personal, așa cum sunt definite ele în legislația în vigoare:
□ sunt de acord
□ nu sunt de acord
2. Exprimarea consimțământului expres referitor la prelucrarea datelor după cum urmează:
a) furnizarea de către Societatea Română de Biologie Celulară a datelor mele cu caracter personal către persoanele implicate în organizarea și evaluarea pentru obținerea burselor în străinătate, a celor implicate în operațiunile financiar contabile legate de stagiul meu de bursă, în vederea bunei desfășurări a concursului pentru care am aplicat și / sau a stagiului de bursă pe care l-am obținut și îl efectuez/l-am efectuat:
□ sunt de acord
□ nu sunt de acord
b) preluarea de către Societatea Română de Biologie Celulară a datelor mele cu caracter personal, de la alte autorități sau instituții publice din țară și din străinătate în vederea bunei desfășurări a concursului pentru care am aplicat și / sau a stagiului de bursă pe care l-am obținut:
□ sunt de acord
□ nu sunt de acord
c) stocarea de către Societatea Română de Biologie Celulară a datelor mele cu caracter personal furnizate, în conformitate cu legislația în vigoare:
□ sunt de acord
□ nu sunt de acord
3. Afișarea publică a rezultatelor concursului organizat de Societatea Română de Biologie Celulară sunt de acord cu folosirea:

- numelui și prenumelui, așa cum apare în documentul de identitate

Am luat cunoștință de faptul că pot reveni oricând asupra acestui consimțământ, prin anunțarea prealabilă, în scris, a Societății Române de Biologie Celulară.

Date de contact:
Mobil _____
E-mail _____
Data Semnătura

Institutul de Biologie şi Patologie Celulară
"Nicolae Simionescu"
Strada B. P Hașdeu, nr. 8, CP 35 – 14, București, România
Tel: (+4021) 319.45.18; 319.45.20; www.icbp.ro

REGULAMENT

privind organizarea examenului de promovare pentru obținerea gradelor profesionale CSIII, CSII și CSI în cadrul Institutului de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" al Academiei Române

Avizat,
Secția de Științe Biologice a Academiei Române

Capitolul I. Dispoziții generale

Articolul 1. Evoluția în cariera științifică a personalului de cercetare-dezvoltare, angajat în Institutului de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu" (IBPC-NS) al Academiei Române, este asigurată şi realizată prin promovarea pe grade profesionale imediat superioare celor deținute.

Articolul 2. Promovarea se face prin examen organizat în conformitate cu prevederile Legii 53/2003 privind Codul Muncii, Legii 183/2024 privind Statutul personalului de cercetare-dezvoltare şi inovare (CDI), Ordinului Ministerului Educatiei Nationale şi Cercetarii ştiintifice nr. 6129/20.12.2016, Normelor metodologice privind organizarea examenului de promovare pentru obținerea gradelor profesionale de cercetare-dezvoltare, emise de către Academia Română la data de 15 iulie 2025 şi în conformitate cu prezentul regulament.

Articolul 3. Prezentul Regulamentul cuprinde metodologia privind organizarea examenului de promovare pentru obținerea gradelor profesionale de cercetare-dezvoltare superioare: CSIII, CSII şi CSI în IBPC-NS.

Articolul 4. Promovarea în grade profesionale a personalului CDI deja încadrat, se realizează prin transformarea postului ocupat într-un post imediat superior acestuia, corespunzător gradului profesional obținut prin examen.

Articolul 5. Cercetătorii ştiințifici din IBPC-NS se diferențiază pe funcții şi grade profesionale de cercetare-dezvoltare, păstrând echivalența cu gradele profesionale prevăzute în Carta Europeană a Cercetătorilor, după cum urmează:

(i) cercetător ştiințific gradul I (CSI), echivalent al cercetătorului senior principal R4, deținând

titlul de doctor;

(ii) cercetător ştiinţific gradul II (CSII), echivalent al cercetătorului senior consacrat R3, deţinând titlul de doctor;

(iii) cercetător ştiinţific gradul III (CSIII), echivalent al cercetătorului recunoscut R2, deţinând titlul de doctor;

(iv) cercetător ştiinţific (CS), echivalent al cercetătorului debutant R1, deţinând titlul de doctor sau având calitatea de student doctorand;

(v) asistent de cercetare ştiinţifică (ACS), echivalent al asistentului în activitatea de cercetare ştiinţifică, licenţiat.

Articolul 6. Numărul de posturi de CDI finanţate de Legea anuală a bugetului de stat este stabilit anual de Academia Română, care va aloca fila de buget în concordanţă cu aceasta şi cu aprobările Ministerului Finanţelor Publice.

Articolul 7. Examenul de promovare se organizează la decizia conducerii IBPC-NS în funcţie de resursele financiare disponibile şi de politica de resurse umane, cu încadrarea în bugetele aprobate şi respectarea prevederilor legale.

Articolul 8. Încadrarea pe posturi a personalului CDI se realizează prin concurs/examen, care este organizat pe baza următoarelor principii:

a. principiul transparenţei, competenţei, egalităţii de gen, nediscriminării şi accesul egal şi echitabil la ocuparea posturilor vacante, respectiv la promovarea în carieră pe un grad profesional imediat superior;

b. principiul asigurării calităţii şi pregătirii profesionale a personalului de cercetare;

c. informarea corectă şi completă privind organizarea şi desfăşurarea concursurilor/examenelor de promovare;

d. transparenţa cu privire la informaţiile administrative, financiare şi de evaluare a posturilor de cercetare conform legislaţiei în vigoare.

Capitolul II. Condiţii minime de pregătire

Articolul 9. Examenul de promovare se organizează la decizia conducerii IBPC-NS, ca urmare a solicitării persoanei care îndeplineşte prevederile Legii nr. 183/2024 privind condiţiile necesare înscrierii, alin. (10) şi (11) şi standardele minimale specifice fiecărui domeniu ştiinţific, alin. (1); dar şi standardele suplimentare stabilite în cadrul Institutului de Biologie şi Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" al Academiei Române (Anexa SC).

Articolul 10. Criteriile în baza cărora sunt elaborate standardele minimale pentru ocuparea funcţiilor şi gradelor profesionale ale personalului CDI din IBPC-NS sunt următoarele:

a. rezultatele activităţii de cercetare şi/sau inovare;

b. impactul activităţii de cercetare şi/sau inovare;

c. capacitatea de a atrage fonduri de cercetare sau de a colabora cu organizaţii publice şi/sau private de cercetare;

d. prestigiul profesional;

e. capacitatea organizatorică;

f. capacitatea de cooperare internațională.

Articol 11. Standardele minimale pentru gradele profesionale de cercetare-dezvoltare stabilite de către Academia Română sunt:

(1) Pentru gradele profesionale CSII și CSI, standardele minimale sunt aprobate prin ordin al ministrului educației;

(2) Pentru gradul profesional CSIII, standardele minimale sunt următoarele:

a. să dețină titlul de doctor în specialitate sau în domenii conexe;

b. cel puțin cinci articole publicate în reviste indexate în *Web of Science – Core Collection*;

c. cel puțin o lucrare comunicată la o conferință internațională.

Articol 12. Standardele minimale necesare și obligatorii suplimentare stabilite de IBPC-NS pentru evaluarea activității profesionale a candidaților sunt prezentate în Anexa SC a Procedurii privind recrutarea, selecția și promovarea personalului CDI. Acestea sunt stabilite și aprobate în Consiliul Științific al IBPC-NS și nu derogă de la standardele minimale prevăzute de lege.

Articolul 13. Cercetătorii științifici CS, CSIII și CSII, care depășesc cu minimum 50%, cel puțin două treimi din standardele minimale proprii ale institutului, prevăzute la Articolul 12, pot susține examen pentru promovarea pe gradul profesional superior în IBPC-NS al Academiei Române cu care au contract individual de muncă pe perioadă nedeterminată, și pot fi promovați prin încheierea unui act adițional la contractul individual de muncă existent. Toate standardele minimale cuprinse în anexa prevăzută la Articolul 12 trebuie îndeplinite și 2/3 din standarde minimale proprii, oricare dintre ele, trebuie depășite cu minimum 50%.

Capitolul III. Desfășurarea examenului

Articolul 14. Calendarul de derulare a examenelor în IBPC-NS, în vederea ocupării posturilor vacante:

a. se întocmește cererea de înscriere la examen și se înaintează spre aprobare Consiliului Științific al IBPC-NS (Anexa 1P);

b. se realizează înscrierea la examen și depunerea dosarului de examen, în maxim 30 zile calendaristice, conform calendarului din anunțul pentru examenul de promovare, publicat pe site-ul institutului;

c. se întocmesc deciziile cu componența comisiei de examen/soluționare a contestațiilor și cu desemnarea președintelui de comisie;

d. dosarele de examen se transmit președintelui comisiei de examen, după înregistrarea și verificarea în prealabil de către secretarul comisiei de examen, în vederea analizei;

e. întreaga procedura de examen trebuie finalizată în termen de 15 de zile de la data încheierii înscrierii la examen, la nivelul comisiei de examen, și de 45 de zile, de la depunerea raportului comisiei de examen și a dosarului către Prezidiul Academiei Române;

f. în termen de maxim 2 zile de la comunicarea rezultatului, candidații au dreptul să depună contestație;

g. în termen de maxim 2 zile lucrătoare de la finalizarea examenului se comunică rezultatul final al examenului.

Articolul 15. Membrii comisiei de examen sunt cercetători ştiinţifici sau cadre didactice universitare cu gradul profesional sau titlul didactic universitar cel puţin egal cu gradul profesional pentru care se organizează examenul. Lucrările comisiei de examen sunt conduse de unul dintre membri comisiei, în calitate de preşedinte, numit prin decizie de către Directorul IBPC-NS. Componenţa comisiei este:

a. de 3 membri, în cazul examenului pentru CS şi CSIII;
b. de 5 membri, din care cel puţin 3 sunt din afara IBPC-NS, pentru CSII şi CSI.

Articolul 16. Examenul de promovare pentru obţinerea gradelor profesionale de CSIII, CSII şi CSI constă în:

c. *analiza dosarului de înscriere la examen* care trebuie să conţină documentele prevăzute în Anexa DP (se vor utiliza doar formularele-tip aprobate de IBPC-NS conform prezentului Regulament: Anexele 1P-5P întocmite conform modelelor propuse în Normele metodologice privind organizarea examenului de promovare pentru obţinerea gradelor profesionale de CDI din institutele Academiei Române/15 iulie 2025);
d. verificarea îndeplinirii condiţiilor prevăzute la Articolulele 11 şi 12;
e. acordarea punctajului pe bază de evaluare conform anexei prevăzute la Articolul 12.

Articolul 17. Rezultatele procesului de evaluare sunt consemnate de către fiecare membru al comisiei de examen în cadrul a câte unui referat de apreciere (Anexa 2E), în baza cărora preşedintele comisiei de examen întocmeşte un raport asupra examenului, semnat de fiecare membru şi propune acordarea gradului profesional de cercetare-dezvoltare candidatului respectiv.

Articolul 18. Consiliul ştiinţific analizează respectarea procedurilor stabilite prin regulament şi aprobă sau nu raportul asupra examenului, prin vot nominal deschis.

Articolul 19. Candidaţii la examen nemulţumiţi de rezultat, pot formula contestaţii care vor fi soluţionate în termen de 2 zile lucrătoare de la înregistrarea lor de către comisia de soluţionare a contestaţiilor, formată din:

a. preşedinte şi 2 membri cercetători ştiinţifici sau cadre didactice universitare, în cazul comisiilor de soluţionare a contestaţiilor înaintate în urma examenelor susţinute pentru ocuparea funcţiilor de execuţie în cercetare;
b. 3 membri, respectiv un membru din cadrul secţiei de specialitate a Academiei Române, Secţia de Biologie, care este şi Preşedintele comisiei, şi 2 membri din IBPC-NS având grad de CSI, în cazul comisiilor de soluţionare a contestaţiilor înaintate în urma examenelor susţinute pentru ocuparea funcţiilor de conducere în cercetare.
c. secretarul comisiei de soluţionare a contestaţiilor va fi numit din cadrul IBPC-NS prin decizie de către Directorul IBPC-NS.

Articolul 20. Comisia de examen şi comisia de soluţionare a contestaţiilor beneficiază de suport administrativ din partea organizaţiei de cercetare, asigurat de un secretar numit prin act administrativ al conducătorului organizaţiei de cercetare, care nu este membru al comisiei de concurs şi nu ia parte la deciziile comisiei. Formularele-tip utilizate de membrii comisilor, vor fi cele propuse şi aprobate conform prezentului Regulament (Anexele 1E şi 2E, întocmite conform modelelor propuse în Normele metodologice privind organizarea examenului de promovare pentru obţinerea gradelor profesionale de CDI din institutele Academiei Române /15 iulie 2025).

Articolul 21. Dosarele de promovare a examenelor pentru obținerea gradele profesionale de CSIII, CSII şi CSI se depun de către IBPC-NS în termen de 10 zile calendaristice de la finalizarea examenului la Secția de Stiințe Biologice a Academiei Române.

Capitolul IV. Rezultatele examenului şi încadrarea pe post

Articolul 22. În urma aprobării rezultatului favorabil al examenului desfăşurat în IBPC-NS de către Prezidiul Academiei Române, Preşedintele Academiei Române emite decizia pentru încadrarea pe post şi acordarea gradului profesional de cercetare-dezvoltare de CSIII, CSII şi CSI candidatului promovat, în conformitate cu prevederile art. 10 din Legea nr. 183/2024.

Articolul 23. După aprobarea rezultatelor examenului de promovare de către Prezidiul Academiei Române, dosarul se restituie IBPC-NS.

Articolul 24. În condițiile Articolului 4, dacă cercetătorul promovează examenul, acesta va fi încadrat pe postul aferent gradului profesional obținut prin examen, prin încheierea unui act adițional la contractul individual de muncă existent. Postul aferent gradului de cercetare superior rezultat din transformarea postului pe care îl ocupa persoana înainte de promovare este bugetat cel târziu începând cu anul următor celui în care s-a realizat promovarea, iar actul adițional la contractul individual de muncă se încheie începând cel târziu cu data de 1 ianuarie a anului următor celui în care s-a realizat promovarea prin examen, în baza deciziei eliberată de către Academia Română.

Articolul 25. Încadrarea pe posturi corespunzătoare funcțiilor şi gradelor profesionale ale personalului CDI se realizează conform principiului meritului profesional, în baza unor proceduri transparente şi echitabile care respectă principiile generale şi condițiile prevăzute de Carta Europeană a Cercetătorilor.

Articolul 26. Echivalarea funcțiilor didactice universitare cu funcțiile şi gradele profesionale CDI din IBPC-NS funcționează numai cu aprobarea Consiliului Ştiințific după evaluarea standardelor suplimentare adoptate în IBPC-NS.

Articolul 27. Datele cu caracter personal ale persoanelor implicate în procesul de examinare sunt prelucrate în cadrul platformei informatice, cu respectarea prevederilor Regulamentului (UE) 2016/679 privind protecția persoanelor fizice în ceea ce priveşte prelucrarea datelor cu caracter personal şi privind libera circulație a acestor date şi de abrogare a Directivei 95/46/CE (Regulamentul general privind protecția datelor).

Articolul 28. Un raport sintetic privind organizarea şi desfăşurarea examenului de promovare se întocmeşte la nivelul IBPC-NS dr către responsabilul resurse umane şi se transmite anual, în termen de 15 zile calendaristice de la finalul anului calendaristic pentru care se face raportarea, atât în format fizic cu adresa de înaintare, către Serviciul Programe de Cercetare şi Doctorat, cât şi în format electronic la adresa de email bpg@acad.ro.

Articolul 29. Anexele DP, L, 1P-5P, 1E şi 2E fac parte din prezentul Regulament şi împreună cu acesta, au fost stabilite şi întocmite de către IBPC-NS în conformitate cu reglementările şi modelele propuse de către Academia Română în cadrul Normelor metodologice privind

organizarea examenului de promovare pentru obţinerea gradelor profesionale de CDI din institutele Academiei Române/15 iulie 2025.

Prezentul Regulament a fost aprobat în şedinţa Consiliului Ştiinţific al IBPC-NS din data **07 August 2025**_. Acesta poate fi ajustat prin calibrarea oferită de examenele pentru fiecare categorie (grad ştiinţific) care se vor desfăşura în continuare.

Director,
Acad. Maya Simionescu

Anexa SC

Standardele minimale proprii Institutului de Biologie şi Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" pentru acordarea gradelor profesionale

Ocuparea posturilor de cercetare-dezvoltare şi inovare (CDI) în cadrul Institutului de Biologie şi Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" (IBPC-NS) se realizează prin concurs organizat pentru ocuparea unui post vacant sau prin examen de promovarea pe un gradul profesional superior celui ocupat.

În vederea participării la concursurile organizate de către IBPC-NS, pentru ocuparea poziţiilor CDI vacante, candidaţii trebuie să îndeplinească obligatoriu standardele minimale legale (conform Legii 183/2024 şi a Ordinului ministrului 6129/2016 privind statutul personalului CDI), dar şi standardele suplimentare proprii IBPC-NS stabilite şi aprobate în Consiliul Ştiinţific.

În vederea promovării, doar cercetătorii ştiinţifici CS, CSIII şi CSII, cu contract individual de muncă pe perioadă nedeterminată, care depăşesc cu minimum 50%, cel puţin două treimi din standardele minimale proprii ale IBPC-NS, pot susţine examen pentru promovarea pe gradul profesional superior în IBPC-NS. Promovarea se face prin încheierea unui act adiţional la contractul individual de muncă existent.

1. Standardele minimale proprii IBPC-NS pentru acordarea gradului profesional de CSI

Cercetătorii ştiinţifici CSII, care au contract individual de muncă pe perioadă nedeterminată, pot susţine examenul pentru promovarea într-un grad profesional superior, în IBPC-NS, cu condiţia să îndeplinească următoarele criterii:

- să îndeplinească toate cele 4 standarde minimale prevăzute la criteriile 1-4;
- să depăşească cu minimum 50% cel puţin trei dintre cele patru standarde minimale.

Promovarea se realizează prin încheierea unui act adiţional la contractul individual de muncă existent.

Criteriul 1. Articole ştiinţifice publicate după doctorat, ca autor principal

Standard minim: Candidatul trebuie să fi publicat, după obţinerea titlului de doctor, cel puţin 4 articole publicate în reviste cotate ISI, cu un AIS* cumulat de minimum 4 – în care figurează ca autor principal (primul autor, autor corespondent sau ultimul autor, după caz).

Pentru promovare (prin depăşirea cu cel puţin 50% a standardului): cel puţin 6 articole publicate în reviste cotate ISI, cu un AIS* cumulat mai mare sau egal cu 6 – în care figurează ca autor principal (primul autor, autor corespondent sau ultimul autor, după caz).

Criteriul 2. Articole ştiinţifice publicate în ultimii 5 ani, ca autor principal

Standard minim: Candidatul trebuie să fi publicat, în ultimii 5 ani, cel puţin **2 articole** în reviste cotate ISI, – fiecare articol având un AIS* de minimum 0,5– în care figurează ca autor principal (primul autor, autor corespondent sau ultimul autor, după caz).

Pentru promovare (prin depăşirea cu cel puţin 50% a standardului): Candidatul trebuie să fi publicat, în ultimii 5 ani, cel puţin **3 articole** în reviste cotate ISI, – fiecare articol având un AIS* de minimum 0,5 – în care figurează ca autor principal (primul autor, autor corespondent sau ultimul autor, după caz).

**Nota:*
- Factorul AIS (Article Influence Score), conform https://jcr.clarivate.com/ din anul publicării; în cazul articolele publicate înainte de 2007 se va utiliza valoarea AIS din 2007. Dacă clasificarea din anul publicării nu este disponibilă, va fi luată în considerare cea mai recentă clasificare disponibilă.
- Valoarea AIS pentru condiţiile preliminare obligatorii se fracţionează după formula: AIS/pi, unde pi are valoarea 1, atunci când articolul are 1, 2 sau 3 autori principali (care sunt: primul, ultimul şi autorul corespondent) sau reprezintă numărul de autori principali ai articolului atunci când numărul acestora este mai mare de 3.
- Minim 50% din articolele ştiintifice publicate trebuie să fie regăsite in Web of Science cu încadrarea la "document type": "article". În acest procent nu intră lucrările având încadrarea "document type": "review"; sau combinaţii multiple precum: „Article; Proceedings Paper", „Article; Book Chapter", etc.

Criteriul 3. Coordonare proiecte de cercetare/granturi, obţinute în perioada de după doctorat:**

Standard minim: Candidatul trebuie să fi coordonat, după obţinerea titlului de doctor, cel puţin două proiecte/granturi de cercetare**, naţionale sau internaţionale, în una dintre următoarele variante:

- două proiecte (naţionale sau internaţionale), în calitate de director de proiect sau responsabil de partener, sau
- un proiect naţional şi un proiect internaţional (în calitate de director sau responsabil naţional).

Notă: Pentru cel puţin unul dintre aceste proiecte, echipa de cercetare coordonată trebuie să includă minimum 3 membri.

Pentru promovare (prin depăşirea cu minimum 50% a standardului): Candidatul trebuie să fi coordonat, după obţinerea titlului de doctor, cel puţin trei proiecte/granturi de cercetare**, naţionale sau internaţionale, în una dintre următoarele variante:

- 3 proiecte/ granturi de cercetare, (naţionale sau internaţionale), în calitate de director sau responsabil de partener; sau

- 2 proiect naţionale şi 1 proiect internaţional (ca director sau responsabil naţional); sau
- 1 proiect naţional şi 2 proiect internaţionale (ca director sau responsabil naţional);

Notă: Pentru cel puţin unul dintre aceste proiecte, echipa de cercetare coordonată trebuie să includă minimum 3 membri.

**Nota*
- Proiectele sa fie obţinute: (1) prin competiţie naţională sau internaţională, caz în care se va preciza link-ul către pagina competiţiei sau alte documente care să demonstreze competiţia; (2) prin atribuire fără competiţie, caz în care bugetul grantului să fie echivalent cu minim 50000 euro.
- Nu se iau în considerare proiectele care nu au cheltuieli de logistică, granturi finanţate de propria instituţie sau granturi pentru participare la congrese.
- Proiectele trebuie sa fie derulate într-o instituţie cu activităţi de cercetare-dezvoltare.

Criteriul 4. Cuantificarea activităţii ştiinţifice

Standard minim: Punctaj total rezultat pe baza calculului indicatorilor din tabelul 1: **500** pct. Σ_1-2 şi **600** pct. Σ_1-18.

Pentru promovare (prin depăşirea cu minimum 50% a standardului): Punctaj total rezultat pe baza calculului indicatorilor din tabelul 1: **750** pct. Σ_1-2 şi **900** pct. Σ_1-18.

Tabel 1 Parametrii luaţi în calcul şi modul lor de cuantificare

Nr. crt.	*Parametrul*	*Mod de calcul*	*Punctaj*
1.	Articole în reviste cotate WoS, ca autor principal	conform formulei (1)	
2.	Articole în reviste cotate WoS, ca şi coautor	conform formulei (2)	
3.	Articole în reviste indexate BDI ca autor principal	(1+C_1)+(1+C_2)+... (1+C_n)	
4.	Articole în reviste indexate BDI ca şi coautor	0.7 x [(1+C_1)+(1+C_2)+... (1+c_n)]	
5.	Cărţi la edituri internaţionale de prestigiu	(100+c):n	
6.	Cărţi la alte edituri internaţionale	(40+c):n	
7.	Cărţi la Editura Academiei Române sau la edituri Universitare	(20+c):n	
8.	Cărţi la alte edituri din ţară	(10+c): n	
9.	Capitole în volume la edituri internaţionale de prestigiu	(50+c):n	
10.	Capitole în volume la alte edituri internaţionale	(20+c): n	
11.	Capitole în volume la editura Academiei sau la edituri Universitare	(10+c): n	
12.	Capitole în cărţi/volume la edituri naţionale	(5+c):n	
13.	Editor/redactor/coordonator cărţi la edituri	(50+c):n	

	internaţionale de prestigiu		
14.	Editor/redactor/coordonator cărţi la alte edituri internaţionale	(30+c):n	
15.	Editor/redactor/coordonator cărţi la edituri naţionale	(20+c): n	
16.	Editor (inclusiv guest editor) la reviste cotate WoS	5 X (AIS_1+AIS_2+ ... AIS_n)	
17.	Proiecte/granturi de cercetare câştigate prin competiţie	1 punct la fiecare 10000 euro atraşi ca director de proiect sau responsabil de partener	
18.	Implicare constantă şi susţinută în activităţile ştiinţifice organizate în cadrul institutului, inclusiv participarea activă la seminarii, workshopuri şi alte manifestări ştiinţifice interne (discuţii, întrebări sau feedback oferit altor colegi în timpul acestor evenimente);	2 puncte per eveniment	

Formula (1):1 x [4+(7xAIS_1)+c1] + 1 x [4+(7xAIS_2)+c2] + ... + 1 x [4+(7XAIS_N)+C_N]
Formula (2):0.7 x [4+(7xAIS_1)+c_1] + 0.7 x [4+(7xAIS_2)+c_2] + ... + 0.7 x [4+(7XAIS_N)+C_N]AIS_1, AIS_2 ..., AIS_N este factorul AIS (Article Influence Score), conform Journal Citation Reports (publicat de Clarivate) din anul publicării. În cazul articolele publicate înainte de 2007 se va utiliza valoarea AIS din 2007. Dacă clasificarea din anul publicării nu este disponibilă, va fi luată în considerare cea mai recentă clasificare disponibilă.
c_1, c_2 ... c_n numărul de citări fără autocitări pentru articolul 1, 2..., N, preluat de pe Web of Science sau Scopus, în momentul întocmirii dosarului, cu specificarea sursei utilizate.
c - citări fără autocitări preluat de pe Web of Science sau Scopus, în momentul depunerii dosarului, cu specificarea sursei utilizate. Se consideră autocitare situaţia în care autorul evaluat citează o lucrare anterioară la care a fost autor.
N - numărul total de articole din categoria respectivă (fără rezumate/abstract, recenzii, comemorări, note, editoriale, corecturi, erate).
n - numărul de autori (editori, redactori, coordonatori pentru cărţile/capitolele editate/elaborate).

Parametrul	Punctaj total rezultat pe baza calculului indicatorilor din tabelul 1
Σ_1-2 (recunoaştere internaţională)	**Standard minim: 500 pct. Pentru promovare 750 pct.**
Σ_1-18 (performanţa totală)	**Standard minim: 600 pct. Pentru promovare 900 pct.**

2. Standardele minimale proprii IBPC-NS pentru acordarea gradului profesional de CSII

Cercetătorii ştiinţifici CS III, care au contract individual de muncă pe perioadă nedeterminată, pot susţine examenul pentru promovarea într-un grad profesional superior, în IBPC-NS, cu condiţia să îndeplinească următoarele criterii:

- să îndeplinească toate cele 3 standarde minimale prevăzute la criteriile 1-3;
- să depășească cu minimum 50% cel puțin două dintre cele trei standarde minimale.

Promovarea se realizează prin încheierea unui act adițional la contractul individual de muncă existent.

Criteriul 1. Articole științifice publicate după doctorat, ca autor principal

Standard minim: Candidatul trebuie să fi publicat, după obținerea titlului de doctor, cel puțin 2 articole științifice în reviste cotate ISI, în care să figureze ca autor principal care să îndeplinească următoarele cerințe:

- AIS* cumulat al celor două articole trebuie să fie cel puțin 2.
- Cel puțin un articol trebuie să fi fost publicat în ultimii 5 ani și să aibă un AIS* de minimum 0,4.

Pentru promovare (depășire cu minimum 50%): Candidatul trebuie să fi publicat, după obținerea titlului de doctor, ca autor principal:

- Minimum 3 articole publicate în reviste cotate ISI, cu un AIS* cumulat de cel puțin 3;
- Cel puțin 2 articole trebuie să fi fost publicate în ultimii 5 ani, fiecare cu un AIS* de minimum 0,4.

**Nota:*
- Factorul AIS (Article Influence Score), conform https://jcr.clarivate.com/ din anul publicării; în cazul articolele publicate înainte de 2007 se va utiliza valoarea AIS din 2007. Dacă clasificarea din anul publicării nu este disponibilă, va fi luată în considerare cea mai recentă clasificare disponibilă.
- Valoarea AIS pentru condițiile preliminare obligatorii se fracționează după formula: AIS/pi, unde pi are valoarea 1, atunci când articolul are 1, 2 sau 3 autori principali (care sunt: primul, ultimul si autorul corespondent) sau reprezintă numărul de autori principali ai articolului atunci când numărul acestora este mai mare de 3.
- Minim 50% din articolele științifice publicate trebuie să fie regăsite in Web of Science cu încadrarea la "document type": "article". In acest procent nu intră lucrările având încadrarea "document type": "review"; sau combinatii multiple precum: „Article; Proceedings Paper", „Article; Book Chapter", etc.

Criteriul 2. Coordonare proiecte de cercetare/granturi, obținute în perioada de după doctorat**:

Standard minim: După obținerea titlului de doctor, candidatul trebuie să fi coordonat cel puțin un proiect sau grant de cercetare, național sau internațional, în calitate de director de proiect sau responsabil de partener.

Pentru promovare (prin depășirea cu minimum 50% a standardului): Candidatul trebuie să fi coordonat minimum două proiecte sau granturi de cercetare (naționale sau internaționale, în calitate de director sau responsabil de partener).

Notă: Pentru cel puțin unul dintre proiectele coordonate, echipa de cercetare trebuie să includă minimum 3 membri.

**Nota*

- Proiectele sa fie obținute: (1) prin competiție națională sau internațională, caz în care se va preciza link-ul către pagina competiției sau alte documente care să demonstreze competiția; (2) prin atribuire fără competiție, caz în care bugetul grantului să fie echivalent cu minim 50000 euro.

- Nu se iau în considerare proiectele care nu au cheltuieli de logistică, granturi finanțate de propria instituție sau granturi pentru participare la congrese.

- Proiectele trebuie sa fie derulate într-o instituție cu activități de cercetare-dezvoltare.

Criteriul 3. Cuantificarea activității științifice

Standard minim: Punctaj total rezultat pe baza calculului indicatorilor din tabelul 1: **300** pct. Σ_1-2 și **450** pct. Σ_1-18.

Pentru promovare (prin depășirea cu minimum 50% a standardului): Punctaj total rezultat pe baza calculului indicatorilor din tabelul 1: **450** pct. Σ_1-2 și **675** pct. Σ_1-18.

Tabel 1 Parametrii luați în calcul și modul lor de cuantificare

Nr. crt.	*Parametrul*	*Mod de calcul*	*Punctaj*
1.	Articole în reviste cotate WoS, ca autor principal	conform formulei (1)	
2.	Articole în reviste cotate WoS, ca și coautor	conform formulei (2)	
3.	Articole în reviste indexate BDI ca autor principal	(1+C_1)+(1+C_2)+... (1+C_n)	
4.	Articole în reviste indexate BDI ca și coautor	0.7 x [(1+C_1)+(1+C_2)+... (1+c_n)]	
5.	Cărți la edituri internaționale de prestigiu	(100+c):n	
6.	Cărți la alte edituri internaționale	(40+c):n	
7.	Cărți la Editura Academiei Române sau la edituri Universitare	(20+c):n	
8.	Cărți la alte edituri din țară	(10+c): n	
9.	Capitole în volume la edituri internaționale de prestigiu	(50+c):n	
10.	Capitole în volume la alte edituri internaționale	(20+c): n	
11.	Capitole în volume la editura Academiei sau la edituri Universitare	(10+c): n	
12.	Capitole în cărți/volume la edituri naționale	(5+c):n	
13.	Editor/redactor/coordonator cărți la edituri internaționale de prestigiu	(50+c):n	
14.	Editor/redactor/coordonator cărți la alte	(30+c):n	

	edituri internaţionale		
15.	Editor/redactor/coordonator cărţi la edituri naţionale	(20+c): n	
16.	Editor (inclusiv guest editor) la reviste cotate WoS	5 X (AIS_1+AIS_2+ ... AIS_n)	
17.	Proiecte/granturi de cercetare câştigate prin competiţie	1 punct la fiecare 10000 euro atraşi ca director de proiect sau responsabil de partener	
18.	Implicare constantă şi susţinută în activităţile ştiinţifice organizate în cadrul institutului, inclusiv participarea activă la seminarii, workshopuri şi alte manifestări ştiinţifice interne (discuţii, întrebări sau feedback oferit altor colegi în timpul acestor evenimente);	2 puncte per eveniment	

Formula (1):1 x [4+(7xAIS_1)+c1] + 1 x [4+(7xAIS_2)+c2] + ... + 1 x [4+(7XAIS_N)+C_N]
Formula (2):0.7 x [4+(7xAIS_1)+c_1] + 0.7 x [4+(7xAIS_2)+c_2] + ... + 0.7 x [4+(7XAIS_N)+C_N]AIS_1, AIS_2 ..., AIS_N este factorul AIS (Article Influence Score), conform Journal Citation Reports (publicat de Clarivate) din anul publicării. În cazul articolele publicate înainte de 2007 se va utiliza valoarea AIS din 2007. Dacă clasificarea din anul publicării nu este disponibilă, va fi luată în considerare cea mai recentă clasificare disponibilă.
c_1, c_2 ... c_n numărul de citări fără autocitări pentru articolul 1, 2..., N, preluat de pe Web of Science sau Scopus, în momentul întocmirii dosarului, cu specificarea sursei utilizate.
c - citări fără autocitări preluat de pe Web of Science sau Scopus, în momentul depunerii dosarului, cu specificarea sursei utilizate. Se consideră autocitare situaţia în care autorul evaluat citează o lucrare anterioară la care a fost autor.
N - numărul total de articole din categoria respectivă (fără rezumate/abstract, recenzii, comemorări, note, editoriale, corecturi, erate).
n - numărul de autori (editori, redactori, coordonatori pentru cărţile/capitolele editate/elaborate).

Parametrul	Punctaj total rezultat pe baza calculului indicatorilor din tabelul 1 / promovare
Σ_1-2 (recunoaştere internaţională)	**Standard minim: 300 pct. Pentru promovare 450 pct.**
Σ_1-18 (performanţa totală)	**Standard minim: 450 pct. Pentru promovare 675 pct.**

3. Standardele minimale proprii IBPC-NS pentru acordarea gradului profesional de CSIII

Cercetătorii ştiinţifici CS, care au contract individual de muncă pe perioadă nedeterminată, pot susţine examenul pentru promovarea într-un grad profesional superior, în IBPC-NS, cu condiţia să îndeplinească următoarele criterii:

- să îndeplinească toate cele 3 standarde minimale prevăzute la criteriile 1-3;
- să depăşească cu minimum 50% cel puţin două dintre cele trei standarde minimale.

Criteriul 1. Articole ştiinţifice publicate

Standard minim: Candidatul trebuie să fi publicat, cel puţin 5 articole ştiinţifice în reviste cotate ISI, în calitate de autor principal sau coautor.

Pentru promovare (prin depăşirea cu minimum 50% a standardului): Este necesară publicarea a cel puţin 8 articole ISI, în calitate de autor principal sau coautor.

Criteriul 2. Articole ştiinţifice publicate cu AIS cumulat minim 2

Standard minim: Candidatul trebuie să fi publicat **cel puţin 2 articole** în reviste cotate ISI, cu un *AIS** cumulat de minimum 2.

Pentru promovare (prin depăşirea standardului cu cel puţin 50%): Este necesară publicarea a **cel puţin 3 articole** în reviste cotate ISI, cu un *AIS** cumulat de minimum 3.

**Nota:*
- Factorul AIS (Article Influence Score), conform https://jcr.clarivate.com/ din anul publicării; în cazul articolele publicate înainte de 2007 se va utiliza valoarea AIS din 2007. Dacă clasificarea din anul publicării nu este disponibilă, va fi luată în considerare cea mai recentă clasificare disponibilă.
- Valoarea AIS pentru condiţiile preliminare obligatorii se fracţionează după formula: AIS/pi, unde pi are valoarea 1, atunci când articolul are 1, 2 sau 3 autori principali (care sunt: primul, ultimul şi autorul corespondent) sau reprezintă numărul de autori principali ai articolului atunci când numărul acestora este mai mare de 3.
- Minim 50% din articolele ştiintifice publicate trebuie să fie regăsite in Web of Science cu încadrarea la "document type": "article". În acest procent nu intră lucrările având încadrarea "document type": "review"; sau combinaţii multiple precum: „Article; Proceedings Paper", „Article; Book Chapter", etc.

Criteriul 3. Cuantificare performanţă ştiinţifică

Standard minim: Punctaj total rezultat pe baza calculului indicatorilor din tabelul 1: **100** pct. Σ_1-2 şi **150** pct. Σ_1-17.

Pentru promovare (prin depăşirea cu minimum 50% a standardului): Punctaj total rezultat pe baza calculului indicatorilor din tabelul 1: **150** pct. Σ_1-2 şi **225** pct. Σ_1-17.

Tabel 1 Parametrii luaţi în calcul şi modul lor de cuantificare

Nr. crt.	*Parametrul*	*Mod de calcul*	*Punctaj*
1.	Articole în reviste cotate WoS, ca autor principal	conform formulei (1)	
2.	Articole în reviste cotate WoS, ca şi coautor	conform formulei (2)	

3.	Articole în reviste indexate BDI ca autor principal	(1+C_1)+(1+C_2)+... (1+C_n)	
4.	Articole în reviste indexate BDI ca şi coautor	0.7 x [(1+C_1)+(1+C_2)+... (1+c_n)]	
5.	Cărţi la edituri internaţionale de prestigiu	(100+c):n	
6.	Cărţi la alte edituri internaţionale	(40+c):n	
7.	Cărţi la Editura Academiei Române sau la edituri Universitare	(20+c):n	
8.	Cărţi la alte edituri din ţară	(10+c): n	
9.	Capitole în volume la edituri internaţionale de prestigiu	(50+c):n	
10.	Capitole în volume la alte edituri internaţionale	(20+c): n	
11.	Capitole în volume la editura Academiei sau la edituri Universitare	(10+c): n	
12.	Capitole în cărţi/volume la edituri naţionale	(5+c):n	
13.	Editor/redactor/coordonator cărţi la edituri internaţionale de prestigiu	(50+c):n	
14.	Editor/redactor/coordonator cărţi la alte edituri internaţionale	(30+c):n	
15.	Editor/redactor/coordonator cărţi la edituri naţionale	(20+c): n	
16.	Editor (inclusiv guest editor) la reviste cotate WoS	5 X (AIS_1+AIS_2+ ... AIS_n)	
17.	Implicare constantă şi susţinută în activităţile ştiinţifice organizate în cadrul institutului, inclusiv participarea activă la seminarii, workshopuri şi alte manifestări ştiinţifice interne (discuţii, întrebări sau feedback oferit altor colegi în timpul acestor evenimente);	2 puncte per eveniment	

Formula (1):1 x [4+(7xAIS_1)+c1] + 1 x [4+(7xAIS_2)+c2] + ... + 1 x [4+(7XAIS_N)+C_N]
Formula (2):0.7 x [4+(7xAIS_1)+c_1] + 0.7 x [4+(7xAIS_2)+c_2] + ... + 0.7 x [4+(7XAIS_N)+C_N]AIS_1, AIS_2 ..., AIS_N este factorul AIS (Article Influence Score), conform Journal Citation Reports (publicat de Clarivate) din anul publicării. În cazul articolele publicate înainte de 2007 se va utiliza valoarea AIS din 2007. Dacă clasificarea din anul publicării nu este disponibilă, va fi luată în considerare cea mai recentă clasificare disponibilă.
c_1, c_2 ... c_n numărul de citări fără autocitări pentru articolul 1, 2..., N, preluat de pe Web of Science sau Scopus, în momentul întocmirii dosarului, cu specificarea sursei utilizate.
c - citări fără autocitări preluat de pe Web of Science sau Scopus, în momentul depunerii dosarului, cu specificarea sursei utilizate. Se consideră autocitare situaţia în care autorul evaluat citează o lucrare anterioară la care a fost autor.
N - numărul total de articole din categoria respectivă (fără rezumate/abstract, recenzii, comemorări, note, editoriale, corecturi, erate).
n - numărul de autori (editori, redactori, coordonatori pentru cărţile/capitolele editate/elaborate).

Parametrul	Punctaj total rezultat pe baza calculului indicatorilor din tabelul 1/promovare
Σ_1-2 (recunoaștere internațională)	**Standard minim: 100 pct. Pentru promovare 150 pct.**
Σ_1-17 (performanța totală)	**Standard minim: 150 pct. Pentru promovare 225 pct.**

4. **Standardele minimale pentru acordarea gradului profesional de CS**

Criteriile minime pentru participarea la concursul de CS:

1. Absolvent cu **examen de licență sau de diplomă** al studiilor în învățământul universitar de lungă durată sau absolvent cu diplomă de master în specialitate sau domenii conexe (doar pentru concurs);
2. Calitatea de doctorand sau doctor în specialitatea disciplinelor postului sau înrudită cu aceasta (doar pentru concurs);
3. Minim două **scrisori de recomandare** de la supervizori și/sau profesori de curs (doar pentru concurs).
4. Un articol științific publicat într-un jurnal cotat ISI în calitate de co-autor în poziția 2 sau 3 sau într-un jurnal cotat BDI ca autor principal (doar pentru concurs).

5. **Standardele minimale pentru acordarea gradelor profesionale de ACS**

Criteriile minime pentru participarea la concursul de ACS:

1. Absolvent cu **examen de licență sau de diplomă** al studiilor în învățământul universitar de lungă durată sau absolvent cu diplomă de master în specialitate sau domenii conexe (doar pentru concurs);
2. Minim două **scrisori de recomandare** de la supervizori și/sau profesori de curs (doar pentru concurs)

Aprobat în ședința Consiliului Științific al IBPC-NS din data_07.08.2025_____.

DIRECTOR ICBP N. Simionescu **26.06.2025**
Acad Maya SIMIONESCU

Documente utilizate pentru documentarea și elaborarea prezentului regulament:
Ordinele ministrului 6129/2016 și 3019/2025 privind aprobarea standardelor minimale (pentru acordarea gradului profesional de cercetător științific gradul II și gradul I); HG 1568/2024, HG 1569/2024, Normele metodologice aprobate de către Biroul Prezidiului Academiei Române, privind organizarea examenului de promovare pentru obținerea gradului profesional de către personalul CDI/iulie 2025; Metodologia de verificare și evaluare a dosarelor ce conțin documentele aferente concursului, respectiv examenului, pentru acordarea gradului profesional de CSII și CSI; Legea 183/2024 privind statutul personalului CDI;

Anexe utile întocmirii dosarului pentru înscrierea la examenul de promovare (candidat):

Anexa DP: Documente necesare înscrierii (dosarului) pentru examenul de promovare și Lista cuprinzând documentele dosarului de examen pentru obținerea gradelor profesionale de cercetare-dezvoltare de CSII și CSI (*conform **ANEXA 1 la metodologie**, Normele metodologice privind organizarea examenului de promovare pentru obținerea gradelor profesionale de CDI din institutele AR);*

Anexa L: Pașii procedurali pentru realizarea linkurilor la documentele justificative/suport din opis *(conform **ANEXA 3 la metodologie,** Normele metodologice privind organizarea examenului de promovare pentru obținerea gradelor profesionale de CDI din institutele AR);*

Anexa 1P: Cerere de înscriere la examen-model (*conform **ANEXA 5 la listă,** Normele metodologice privind organizarea examenului de promovare pentru obținerea gradelor profesionale de CDI din institutele AR*);

Anexa 2P: Copertă dosar de examen-model *(conform **ANEXA 1 la listă**, Normele metodologice privind organizarea examenului de promovare pentru obținerea gradelor profesionale de CDI din institutele AR);*

Anexa 3P: Declarație pe proprie răspundere (candidat)-model (*conform **ANEXA 3 la listă,** Normele metodologice privind organizarea examenului de promovare pentru obținerea gradelor profesionale de CDI din institutele AR)*;

Anexa 4P: Declarație de consimțământ privind prelucrarea datelor cu caracter personal, conform Regulamentului (UE) 2016/679-model *(conform **ANEXA 4 la listă**, Normele metodologice privind organizarea examenului de promovare pentru obținerea gradelor profesionale de CDI)*;

Anexa 5P: Fișa de verificare a îndeplinirii standardelor specifice postului/gradului profesional.

Anexe utile procesului de evaluare a dosarelor (comisii, IBPC-NS):

Anexa 1E: Declarație (evaluator)-model *(conform **ANEXA 2 la metodologie**, Normele metodologice privind organizarea examenului de promovare pentru obținerea gradelor profesionale de CDI din institutele AR);*

Anexa 2E: Referat de apreciere (membru comisie)-model *(conform **ANEXA 3 la listă**, Normele metodologice privind organizarea examenului de promovare pentru obținerea gradelor profesionale de CDI din institutele AR*).

Documente necesare înscrierii la examenul de promovare

a. cererea de înscriere la examen, la care se anexează o declaraţie pe propria răspundere privind veridicitatea informaţiilor prezentate în dosar, completate şi semnate în original de către candidat (Anexa 1P şi Anexa 3P);

a. curriculum-ul vitae după model EUROPASS semnat de către candidat (Anexa 3), obligatoriu să conţină: i. studiile efectuate şi diplomele obţinute; ii. experienţa profesională şi locurile de muncă relevante ocupate anterior; iii. proiectele de cercetare, dezvoltare şi inovare pe care le-a condus ca director de proiect şi granturile obţinute, dacă este cazul, indicându-se pentru fiecare sursa de finanţare, volumul finanţării şi principalele publicaţii sau brevete de invenţie rezultate; iv. premiile sau alte elemente de recunoaştere a contribuţiilor ştiinţifice; v. descrierea narativă a celor mai importante 3 realizări de la ultima promovare- maximum 3 pagini;

b. lista publicaţiilor, lucrărilor, articolelor/studiilor, brevetelor de invenţie selectate de candidat în funcţie de relevanţa pentru activităţile de cercetare ştiinţifică proprii, semnate în original de către candidat (Anexa 4). Lista trebuie să conţină obligatoriu: i. lista a cel mult 10 publicaţii ştiinţifice, cele mai relevante, precum: cărţi de autor, articole/studii/capitole, volume editate, lucrări; ii. lista brevetelor de invenţie şi a altor titluri de proprietate industrială; iii. lista cărţilor de autor şi a volumelor editate şi publicate; iv. lista articolelor/studiilor in extenso, publicate în reviste din fluxul ştiinţific internaţional principal; v. lista altor lucrări şi contribuţii ştiinţifice;

c. fişa de verificare a îndeplinirii standardelor proprii ale organizaţiei de cercetare, completată şi semnată de către candidat (Anexa 5P);

d. copia actului de identitate sau orice alt document care atestă identitatea, potrivit legii, după caz, certificată de către candidat conform cu originalul, numele în clar şi semnătura;

e. copia certificatului de căsătorie sau dovada schimbării numelui, după caz, certificată de către candidat conform cu originalul, numele în clar şi semnătura;

f. certificatul medical care să ateste starea de sănătate corespunzătoare, eliberată de către medicul de familie al candidatului sau de către unităţile sanitare abilitate cu cel mult 3 luni anterior derulării examenului;

g. declaraţia de consimţământ pentru prelucrarea datelor cu caracter personal semnată (Anexa 4P);

h. certificatul de cazier judiciar.

i. copia diplomei de doctorat, în situaţia în care diploma nu a fost eliberată de o instituţie de învăţământ superior din România se depune o copie a atestatului de recunoaştere sau de echivalare a acesteia, certificată de către candidat conform cu originalul, numele în clar şi semnătura;

j. declaraţia pe propria răspundere în care se menţionează că, în ultimii 3 ani anteriori înscrierii la examenul de promovare, candidatul nu a fost sancţionat pentru săvârşirea unei abateri grave de la buna conduită în activitatea CDI prevăzute la art. 52 alin. (8) din Legea

nr. 183/2024, completată şi semnată de către candidat (Anexa 3P).

Documentele se depun în dosar format fizic, cât şi în format electronic (fiecare document din dosarul fizic va fi scanat conform opis-ului şi salvat pe un memory stick) la sediul IBPC-NS, dar şi la adresa de e-mail indicată în anunţ.

Dosarul de examen pentru ocuparea postului de CSII sau CSI se constituie din două părţi, astfel:
a) dosarul administrativ cuprinde documentele menţionate la punctele **a-j** şi documentele emise pe durata desfăşurării examenului. Toate documentele se înregistrează, se atribuie un link fiecărui document, conform paşilor procedurali prevăzuţi în Anexa L, se opisează şi se numerotează, apoi vor fi scanate în ordinea menţionată în "Lista cuprinzând documentele dosarului de concurs, respectiv examen", prevăzută în Anexa DP;
b) mapa cu lucrări ştiinţifice - lucrările se scanează în format PDF, se atribuie un link fiecărui document, apoi se numerotează şi se opisează.

LISTA
cuprinzând documentele dosarului de examen pentru obţinerea gradele profesionale de cercetare-dezvoltare de CSII şi CSI

Documentele de mai jos vor fi îndosariate în format electronic, de tip PDF, separate, ataşate în ordinea prevăzută de opis. Documentele vor fi numerotate conform opisului.
Dosarul de examen se depune numai în formă completă, conţinând toate documentele aferente postului pentru care candidatul aplică, în ordinea în care figurează mai jos. Introducerea de informaţii false sau documente neconforme în dosarul de examen se sancţionează conform normelor legale.

Formularul-tip al copertei se completează de către candidat potrivit Anexei 2P.

Fiecare dosar de examen pentru acordarea gradelor profesionale de CSII şi CSI va cuprinde următoarele documente:
A. Dosar administrativ
1. Adresa de înaintare pentru fiecare dosar din partea conducerii institutelor de cercetare/centrelor de cercetare/filialelor Academiei Române către Academia Română, care va conţine: numele şi prenumele candidatului, gradul ştiinţific actual, organizaţia din care face parte sau care organizează examenul, gradul ştiinţific pentru care este înscris la examen, domeniul postului vizat - comisia de specialitate - domeniul fundamental şi domeniul arondat, numărul de file al dosarului, numărul de înregistrare şi datele de contact ale persoanei/instituţiei emitente pentru detalii/informări şi transmiterea rezultatului evaluării.
2. Opis cu documentele din dosar cu indicarea paginii unde se găseşte fiecare document, cu link-urile aferente potrivit Anexei L.

3. Referat de prezentare a examenului aprobat de conducerea instituţiei organizatoare:
- se prezintă etapele examenului - de la publicarea anunţului de examen, data anunţului, unde a fost publicat, decizia de numire a comisiei de examen şi a comisiei de contestaţii, rezultatele evaluării, până la validarea rezultatelor în consiliul ştiinţific;
- se va menţiona domeniul, Secţia ştiinţifică din cadrul Academiei Române care va evalua dosarul candidatului;
- se va face trimitere la pagina de internet proprie a regulamentului de examen pentru posturile/gradele de CSI şi CSII, aprobată de conducerea unităţii organizatoare
4. Extras din procesul-verbal al şedinţei consiliului ştiinţific - data, membrii consiliului şi membrii prezenţi, aprobarea rezultatelor examenului de promovare
5. Extras din şedinţa Consiliului ştiinţific privind aprobarea organizării examenului de promovare pentru institutele de cercetare/centrele de cercetare din cadrul Academiei Române. În cazul Filialelor Academiei Române, aprobarea Preşedintelui Filialei/Biroului de conducere al Filialei/ ca urmare a avizării Consiliului ştiinţific privind propunerea institutelor din subordine de organizare a examenelor de promovare.
6. Raportul comisiei de examen, elaborat cu respectarea prevederilor legale, ce cuprinde toate etapele de desfăşurare a examenului de promovare.
7. Referatul de apreciere a membrilor comisiei de examen de promovare pentru obţinerea gradului profesional de CSII sau CSI, prevăzut la Anexa 2E la prezenta listă, şi declaraţia, pe propria răspundere prevăzută la Anexa 1E. Ambele documente trebuie să fie asumate de cei în cauză, semnate, datate şi înregistrate la secretariatul IBPC-NS.
8. Decizia de numire a comisiilor de examen şi de contestaţii, menţionându-se funcţia, gradul universitar sau de cercetare, numele şi prenumele, precum şi locul de muncă pentru fiecare membru al comisiei.
9. Cererea de înscriere la examen, înregistrată, semnată şi datată de candidat, aprobată de conducătorul organizaţiei de cercetare şi inovare şi avizată de compartimentul juridic al acesteia, după caz, prevăzută la Anexa 1P.
10. Fişa de verificare a îndeplinirii standardelor specifice postului/gradului profesional pentru care candidează, care este completată şi asumată de candidat şi avizată de organizaţia de cercetare în domeniul solicitat de candidat conform prevederilor legale. Se vor lua în considerare numai publicaţiile apărute, adică cele care au volum, număr, pagini şi/sau un identificator digital, conform standardelor internaţionale. Fişa va fi completată într-un format care să faciliteze verificarea informaţiilor; în coloane paralele vor fi introduse valorile standardelor minimale impuse de actele normative şi valorile finale obţinute de către candidat pentru fiecare standard (Anexa 5P).
11. Propunerea de dezvoltare a carierei ştiinţifice din punctul de vedere al activităţilor de cercetare ştiinţifică, formată din maximum 5 pagini.
12. Declaraţia de asumare a răspunderii, printr-un înscris olograf semnat de candidat, cu toate datele de identificare ale acestuia, în care afirmă că datele din dosar se referă la propriile activităţi şi realizări, în caz contrar candidatul suportând consecinţele declaraţiilor în fals, în conformitate cu legislaţia în vigoare. De asemenea, candidatul îşi asumă răspunderea cu privire la

asigurarea originalităţii conţinutului mapei ştiinţifice, precum şi a respectării standardelor de calitate şi de etică profesională potrivit Anexei 3P.

13. Declaraţie de consimţământ privind prelucrarea datelor cu caracter personal, conform Regulamentului (UE) 2016/679, prevăzută la Anexa 4P.

14. Curriculum Vitae al candidatului - model Europass, în format electronic, de tip PDF, cu datele de contact, datat şi semnat de acesta.

15. Informaţii despre premii sau alte elemente de recunoaştere a contribuţiilor ştiinţifice ale candidatului.

16. Actele doveditoare ale studiilor - copia diplomei de licenţă sau echivalentă/masterat/doctorat, după caz, conformă cu originalul. În situaţia în care candidatul declarat câştigător nu deţine o diplomă eliberată de o instituţie de învăţământ superior din România, acesta trebuie să depună o copie conformă cu originalul a atestatului de recunoaştere sau de echivalare a acesteia înainte de încadrarea pe post şi semnarea contractului individual de muncă, sub sancţiunea neemiterii actului administrativ de încadrare pe post.

17. Actele doveditoare ale identităţii.

a) copie după certificatul de naştere;

b) în cazul în care candidatul şi-a schimbat numele, copie după documentul care atestă schimbarea numelui - certificat de căsătorie sau dovada schimbării numelui;

c) copia actului de identitate sau orice alt document care atestă identitatea, potrivit legii.

18. Certificat de cazier judiciar.

19. Actul doveditor al stării de sănătate eliberat de către medicul de familie al candidatului.

20. Copie a anunţului privind examenul de promovare, care a fost afişat la sediul instituţiei şi pe site-ul instituţiei organizatoare.

B. Mapă cu lucrări ştiinţifice

Lista publicaţiilor ştiinţifice pe categorii, lucrărilor, articolelor/studiilor, brevetelor considerate de candidat a fi relevante pentru domeniul postului pentru care candidează, pentru activităţile de cercetare ştiinţifică proprii, proiecte de cercetare-dezvoltare pe bază de contract/grant, altele (inclusiv citările).

Lista este structurată astfel:

a) teza sau tezele de doctorat;

b) lista celor mai relevante 10 publicaţii ştiinţifice (cărţi de autor, articole/studii/capitole, volume editate);

c) lista brevetelor de invenţie şi a altor titluri de proprietate industrială;

d) lista cărţilor de autor şi a volumelor editate şi publicate;

e) lista articolelor/studiilor in extenso, publicate în reviste din fluxul ştiinţific internaţional principal;

f) lista altor lucrări şi contribuţii ştiinţifice sau, după caz, din domeniul creaţiei artistice sau apărării naţionale;

g) proiecte de cercetare-dezvoltare-inovare pe bază de contract/grant;

h) alte lucrări.

NOTĂ:
Toate documentele din dosar se înregistrează la secretariatul unităţii organizatoare a examenului de promovare, iar pe cele care sunt în copie se menţionează "conform cu originalul", se semnează şi se datează.

Anexa L

Paşii procedurali pentru realizarea linkurilor la documentele justificative/suport din opis:

A. Copierea iniţială a opisului şi a documentelor pe suport USB

B. Pentru atribuirea unui link fiecărui document din opis se va proceda astfel:

1. Se selectează textul pe care se doreşte introducerea linkului.

2. În meniul Insert -> faceţi click pe iconiţa Link

[sau apăsaţi simultan tastele Ctrl şi K (Ctrl + K)].
3. Din fereastra Insert Hyperlink se selectează cu click doc. căruia se doreşte să i se facă legătură.
4. Se apasă OK.
5. După introducerea linkului se verifică legătura apăsând tasta Ctrl şi făcând simultan click(Ctrl+Click).

După salvarea documentului ca PDF, linkurile ar trebui să fie funcţionale.

După definitivarea linkurilor se verifică funcţionalitatea acestora.

(Antet)

Anexa 1P

Nr...../.....

Aprob
Director IBPC-NS,

CERERE DE ÎNSCRIERE LA EXAMEN

Doamnă director,

Subsemnatul(a), ..., absolvent(ă) al(a) ....., numit(ă) în funcția de ..... la Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu", adresa de e-mail ....., telefon mobil ....., vă rog să binevoiți a-mi aproba înscrierea la examenul pentru promovarea pe gradul profesional de cercetător științific ....., normă întreagă, pe perioadă nedeterminată, la departamentul..... din cadrul Institutului ....., specializarea ....., subdomeniul ..... .
Menționez că sunt absolvent(ă) cu diplomă de doctor și am o vechime în specialitate de ..... ani.
Anunțul privind concursul a fost publicat în ..... (data și locul).....(doar dacă este cazul).

Data
.....

Semnătura
.....

(Cod formular și nr. pag. - subsol)

(Antet)

Anexa 2P

Copertă dosar de examen

Institutul de cercetare/Centrul de cercetare/Filiala Academiei Române

Postul: cercetător ştiinţific gradul .....

DOSAR DE EXAMEN

Candidat

(numele şi prenumele, titlul ştiinţific).....

Telefon: .....

(Cod formular şi nr. pag. - subsol)

(Antet)

Se va întocmi de către fiecare candidat

Anexa 3P

DECLARAŢIE PE PROPRIA RĂSPUNDERE

Subsemnatul(a), ..., salariat(ă) al/la Institutul de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu", în funcţia de ....., născut(ă) la data de ....., cu domiciliul stabil în localitatea ....., str. ..... nr. ....., judeţul ....., CNP ....., BI/CI seria ..... nr. ....., cunoscând prevederile art. 326 din Codul penal cu privire la falsul în declaraţii, declar prin prezenta, pe propria răspundere, că documentele şi datele din dosarul depus pentru ocuparea postului de ....., în domeniul ....., la Institutul de Biologie şi Patologie Celulară "Nicolae Simionescu", prezintă propriile mele realizări şi activităţi şi iau cunoştinţă de faptul că, în caz contrar, voi suporta consecinţele declaraţiei în fals, în conformitate cu legislaţia în vigoare.
Totodată, declar pe propria răspundere că în ultimii 3 ani, anteriori înscrierii la examenul de promovare, nu mi s-a aplicat nicio sancţiune disciplinară privind săvârşirea de abateri grave de la buna conduită în activitatea CDI prevăzute la art. 52 alin. (8) din Legea nr. 183/2024.

Data
.....

Semnătura
.....

1. Cererea se semnează olograf sau cu semnătură electronică certificată.
2. Se scriu cu majuscule numele, iniţiala tatălui şi prenumele.

NOTĂ:
Art. 326. - Falsul în declaraţii
"(1) Declararea necorespunzătoare a adevărului, făcută unei persoane dintre cele prevăzute în art. 175 sau unei unităţi în care aceasta îşi desfăşoară activitatea în vederea producerii unei consecinţe juridice, pentru sine sau pentru altul, atunci când, potrivit legii ori împrejurărilor, declaraţia făcută serveşte la producerea acelei consecinţe, se pedepseşte cu închisoare de la 6 luni la 2 ani sau cu amendă. (...)"

(Cod formular şi nr. pag. - subsol)

(Antet)
Se va întocmi de către fiecare candidat

Anexa 4P

DECLARAȚIE DE CONSIMȚĂMÂNT
privind prelucrarea datelor cu caracter personal, conform Regulamentului (UE) 2016/679

Subsemnatul(a), ..., domiciliat(ă) în ....., născut(ă) la data de ..... în localitatea ....., județul ....., posesor/posesoare al/a C.I. seria ... nr. ....., emisă la data de ..... de către ....., având CNP ....., în calitate de participant(ă) la examenul de promovare din ..... în ....., organizat de către Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu", declar prin prezenta că sunt de acord cu utilizarea și prelucrarea datelor mele cu caracter personal de către personalul desemnat din minister, inclusiv cu comunicarea lor, dacă va fi necesar, către alte entități (Comisia Națională de Atestare a Titlurilor, Diplomelor și Certificatelor Universitare, Colegiul Consultativ pentru Cercetare, Dezvoltare și Inovare etc.).

Am fost informat(ă) cu privire la prevederile Regulamentului (UE) 2016/679 privind protecția persoanelor fizice în ceea ce privește prelucrarea datelor cu caracter personal și privind libera circulație a acestor date și de abrogare a Directivei 95/46/CE (Regulamentul general privind protecția datelor) adoptat de Parlamentul European și Consiliul Uniunii Europene, respectiv:

— dreptul de acces conform căruia persoana are dreptul de a obține o confirmare din partea Autorității Naționale pentru Cercetare (*ANC*) că prelucrează sau nu prelucrează datele cu caracter personal și, în caz afirmativ, de a obține acces la datele respective și la informații privind modalitatea în care sunt prelucrate;

— dreptul la portabilitatea datelor se referă la dreptul de a primi datele personale într-un format structurat, utilizat în mod curent, și la dreptul ca aceste date să fie transmise direct altui operator, dacă acest lucru este fezabil din punct de vedere tehnic;

— dreptul la opoziție vizează dreptul persoanei de a se opune prelucrării datelor personale;

— dreptul la rectificare se referă la corectarea, fără întârzieri nejustificate, a datelor cu caracter personal inexacte;

— dreptul la ștergerea datelor („dreptul de a fi uitat") înseamnă dreptul persoanei de a solicita să îi fie șterse datele cu caracter personal, fără întârzieri nejustificate, în cazul în care apare unul din următoarele motive: acestea nu mai sunt necesare pentru îndeplinirea scopurilor pentru care au fost colectate sau prelucrate; persoana își retrage consimțământul și nu există niciun alt temei juridic pentru prelucrare;

— dreptul la restricționarea prelucrării poate fi exercitat în cazul în care persoana contestă exactitatea datelor, pe o perioadă care permite instituției verificarea corectitudinii acestora; prelucrarea este ilegală, iar persoana se opune ștergerii datelor cu caracter personal, solicitând în schimb restricționarea.

Mi s-a adus la cunoștință despre faptul că refuzul meu de a furniza datele cu caracter personal necesare și solicitate către ANC determină imposibilitatea stabilirii raporturilor cu privire la promovare și nu este imputabil instituției mai sus menționate.

Dacă datele cu caracter personal furnizate sunt incorecte sau vor suferi modificări (schimbare de domiciliu, statut civil, adresă de e-mail etc.) mă oblig să informez în scris, în timp util, ANC.

Totodată am fost informat(ă) cu privire la faptul că aceste date vor fi tratate confidențial, în conformitate cu prevederile Regulamentului (UE) 2016/679 al Parlamentului European și al Consiliului din data de 27 aprilie 2016 privind protecția persoanelor fizice în ceea ce privește prelucrarea datelor cu caracter personal.

Data

.....

Semnătura

.....

(Cod formular și nr. pag. - subsol)

(Antet)

Se va întocmi de către fiecare candidat

Anexa 5P

Fişa de verificare a îndeplinirii standardelor specifice postului

pentru gradul profesional_____

Nr.Crt.	Criteriu/Standard	Standard minimal	Valoare standard îndeplinit

Se va completa urmărind standardele minimale proprii Institutului de Biologie şi Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" pentru acordarea gradelor profesionale, prevăzute în anexa SC a Procedurii privind recrutarea, selecţia şi promovarea personalului CDI în IBPC-NS"

Data.....

Nume şi prenume.....
Semnătura.....

(Cod formular şi nr. pag. - subsol)

(Antet)

Declaraţie evaluator

Anexa 1E

DECLARAŢIE

Subsemnatul(a), ..., grad didactic/titlul ştiinţific ....., fiind implicat(ă) în procedura de evaluare a dosarelor de examen pentru promovare pe gradul profesional de ..... la Institutul de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu", menţionez că am luat cunoştinţă de prevederile actelor normative în vigoare privind incompatibilităţile persoanelor implicate în procedura de examen şi, sub sancţiunea Codului penal pentru fals în declaraţii, declar pe propria răspundere că nu mă aflu în această situaţie.

Data

.....

Semnătura

.....

(Cod formular şi nr. pag. – subsol)

(Antet)

Se va întocmi de către fiecare membru al comisiei de examen

Anexa 2E

REFERATUL DE APRECIERE

privind examenul pentru obţinerea gradului profesional de CS.....

Subsemnatul, ..., gradul didactic/de cercetător ....., la ....., numit prin Decizia directorului/rectorului nr. ..... din ..... ca membru în comisia de examen/contestaţie pentru obţinerea gradului profesional de cercetător ştiinţific ..... în Institutul de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu", în urma evaluării datelor prezentate în dosarul de examen şi a probelor susţinute de către candidatul/candidata ....., am constatat următoarele:

1. Îndeplinirea standardelor minimale şi a standardelor specifice IBPC-NS:

.....

.....

Nota:

2. Evaluarea activităţii ştiinţifice anterioare ale candidatului:

.....

.....

Nota:

3. Evaluarea dosarului de înscriere şi a candidatului la interviu:

.....

.....

Nota:

4. Rezultate obţinute - gradul de îndeplinire a criteriilor:

.....

.....

Nota:

5. Concluzii:

.....

.....

Nota:

Data.....

Semnătura.....

(Cod formular şi nr. pag. - subsol)

Institutul de Biologie și Patologie Celulară
"Nicolae Simionescu"
Strada B. P Hașdeu, nr. 8, CP 35 – 14, București, România
Tel: (+4021) 319.45.18; 319.45.20; www.icbp.ro

REGULAMENT

privind organizarea concursului pentru ocuparea posturilor vacante ale personalului de cercetare în cadrul Institutului de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" al Academiei Române

-Ediția I, Revizia 1-

Capitolul I. Dispoziții generale

Articolul 1. Prezentul Regulamentul stabilește metodologia de ocupare a posturilor vacante de cercetare, diferențiate pe grade profesionale, pentru personalul implicat în activități de cercetare-dezvoltare și inovare (CDI), în cadrul Institutului de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu" (IBPC-NS) al Academiei Române.

Articolul 2. Ocuparea pozițiilor vacante se realizează prin concurs organizat în conformitate cu prevederile Legii 53/2003 privind Codul Muncii, Legii 183/2024 privind Statutul personalului de CDI, Ordinului Ministerului Educației Naționale și Cercetării științifice nr. 6129/20.12.2016, Normelor metodologice privind organizarea concursurilor pentru ocuparea posturilor vacante ale personalului CDI emise de către Academia Română la data de 15 iulie 2025 și în conformitate cu prezentul regulament aprobat la nivelul IBPC-NS, avizat de Secția de Științe Biologice și publicat pe site-ul institutului.

Articolul 3. Regulamentul se aplică tuturor persoanelor care doresc să ocupe în IBPC-NS, pe durată determinată sau nedeterminată, una din următoarele funcții și grade profesionale de cercetare-dezvoltare, definite conform Legii 183/2024 și păstrând echivalența cu gradele profesionale prevăzute în Carta Europeană a Cercetătorilor, după cum urmează:

(i) cercetător științific gradul I (CSI), echivalent al cercetătorului senior principal R4, deținând titlul de doctor;
(ii) cercetător științific gradul II (CSII), echivalent al cercetătorului senior consacrat R3, deținând titlul de doctor;
(iii) cercetător științific gradul III (CSIII), echivalent al cercetătorului recunoscut R2, deținând titlul de doctor;
(iv) cercetător științific (CS), echivalent al cercetătorului debutant R1, deținând titlul de doctor sau având calitatea de student doctorand;
(v) asistent de cercetare științifică (ACS), echivalent al asistentului în activitatea de cercetare științifică, licențiat.

Articolul 4. Încadrarea pe posturi a personalului CDI se realizează prin concurs, organizat pe baza următoarelor principii:

a. principiul transparenţei, competenţei, egalităţii de gen, nediscriminării și accesul egal și echitabil la ocuparea posturilor vacante;
b. principiul asigurării calităţii și pregătirii profesionale a personalului de cercetare;
c. informarea corectă și completă privind organizarea și desfăşurarea concursurilor;
d. transparenţa cu privire la informaţiile administrative, financiare și de evaluare a posturilor de cercetare conform legislaţiei în vigoare.

Articolul 5.

(1) Angajarea pe posturile de cercetare vacante cu contract individual de muncă, pe perioadă nedeterminată sau determinată, este posibilă numai pentru candidatul declarat câştigător în urma concursului organizat.

(2) Angajarea pentru participarea la proiecte de cercetare, proiecte în domeniul educaţiei şi formării profesionale sau în orice alte tipuri de proiecte, indiferent de sursa de finanţare, se poate face pe perioadă determinată, cel mult egală cu durata derulării proiectului respectiv, fără parcurgerea altor formalităţi prealabile şi/sau procese de selecţie, pentru personalul nominalizat în listele de personal, corespunzător gradului deținut, ca membri în echipa proiectului, precum şi pentru personalul organizaţiei de cercetare. În cazul personalului din IBPC-NS, angajarea în cadrul unui proiect se realizează în baza deciziei Directorului, prin încheierea unui contract individual de muncă. Salariul este acordat în limita fondurilor disponibile, conform prevederilor din contractul de finanţare/regulilor finanţatorului. IBPC-NS poate refuza încheierea contractului individual de muncă, după caz, cu persoane din afara instituției care au fost nominalizate, fără a avea acordul prealabil al organizaţiei de cercetare, în listele de personal, ca membri în echipa unui proiect de cercetare, în echipa unui proiect în domeniul educaţiei şi formării profesionale sau în echipa oricărui alt tip de proiecte.

(3) La concursul pentru un post de cercetare vacant pot participa toate persoanele care nu deţin gradul profesional de cercetare-dezvoltare corespunzător postului pentru care candidează şi îndeplinesc standardele proprii stabilite de IBPC-NS. De asemenea, pot participa toate persoanele care deţin gradul profesional de cercetare-dezvoltare corespunzător postului pentru care candidează şi îndeplinesc standardele suplimentare specifice IBPC-NS, fie că sunt sau nu sunt deja încadrate în sistemul naţional CD, fără nicio discriminare, în condiţiile legii.

Ocuparea posturilor de cercetare, prin concurs, de către personalul de cercetare, dezvoltare şi inovare, denumit în continuare personal CDI este de competența IBPC-NS cu respectarea prezentelor norme metodologice, precum şi a principiilor generale şi a condiţiilor prevăzute de Carta europeană a cercetătorilor.

Capitolul II. Condiții minime de pregătire

Articolul 6. IBPC-NS organizează concurs pentru ocuparea unuia sau mai multor posturi de CDI numai dacă acestea sunt vacante și în baza unei note de fundamentare în care se propune scoaterea la concurs a postului.

Articolul 7. Se pot înscrie la concurs numai absolvenţii unităţilor de învăţământ superior acreditate, care au studii superioare de lungă durată, absolvite cu diplomă de licenţă sau echivalentă, ori studii superioare echivalente (studii universitare de licență și studii de masterat potrivit Legii 288/2004) și care îndeplinesc prevederile Legii nr. 183/2024 privind condiţiile necesare înscrierii, alin. (10-11), standardele minimale specifice fiecărui domeniu ştiinţific, alin. (1), dar și standardele suplimentare stabilite și aprobate în cadrul IBPC-NS al Academiei Române (conform Anexei SC.C)

Articolul 8. Pot participa la concurs numai persoanele care îndeplinesc urmatoarele condiții generale:

a. au cetațenie română, cetățenie a altor state membre ale Uniunii Europene sau a statelor aparținând Spațiului Economic European și domiciliul/rezidență în România;
b. au vârsta minima reglementată de prevederile legale;
c. au capacitate deplină de exercițiu;
d. au o stare de sănătate corespunzătoare postului pentru candidează, atestată pe baza adeverinței medicale eliberată de medicul de familie sau de unitățile sanitare abilitate;
e. îndeplinesc condițiile specifice postului scos la concurs;
f. nu au fost condamnați definitiv pentru săvârșirea unei infrcțiuni contra umanității, contra statului ori contra autorității.

Articol 9. Conform Legii 183/2024 privind Statutul personalului CDI (pentru gradele profesionale ACS, CS și CSIII) și a Ordinului Ministerului Educatiei Nationale și Cercetarii științifice nr. 6129/20.12.2016 (pentru gradele profesionale CSII și CSI), sunt stabilite standarde minimale obligtorii pe care trebuie să le îndeplinească persoanele care participă la concurs pentru obținerea unui post CDI.

(1) Pentru gradul profesonal ACS, standardele minimale obligatorii sunt următoarele:
a. să fie absolvent cu diplomă de licență sau diplomă de studii universitare de lungă durată, ori absolvent cu diplomă de master în specialitate sau într-un domeniu conex;
b. minim doua scrisori de recomandare de la supervizori și/sau profesori de curs.

(2) Pentru gradul profesional CS, standardele minimale obligatorii sunt următoarele:
a. să îndeplinească condițiile de obținere a gradului de ACS;
b. să fie înscris la școala doctorală sau să dețină titlul de doctor în specialitate sau domenii conexe.

(3) Pentru gradul profesional CSIII, standardele minimale obligatorii sunt următoarele:
a. să dețină titlul de doctor în specialitate sau domenii conexe;

b. cel puțin cinci articole publicate în reviste indexate în baze de date internaționale (se exclude Google Scholar);
c. cel puțin o lucrare comunicată la o conferință internațională.

(4) Pentru gradele profesionale CSII și CSI, standardele minimale obligatorii sunt următoarele:
a. să dețină titlul de doctor în specialitate sau domenii conexe;
b. standardele minimale aprobate prin ordin al ministrului educației și cercetării;
c. să dețină atestatul de abilitare (pentru obținerea gradului de CSI).

Articolul 10. Criteriile în baza cărora sunt elaborate standardele minimale pentru ocuparea funcțiilor și gradelor profesionale ale personalului CDI din IBPC-NS sunt următoarele:
a. rezultatele activității de cercetare și/sau inovare;
b. impactul activității de cercetare și/sau inovare;
c. capacitatea de a atrage fonduri de cercetare sau de a colabora cu organizații publice și/sau private de cercetare;
d. prestigiul profesional;
e. capacitatea organizatorică;
f. capacitatea de cooperare internațională.

Capitolul III. Cadrul general de organizare a concursului

Articolul 11.
(1) IBPC-NS organizează concurs pentru ocuparea unuia sau mai multor posturi de CDI numai dacă acestea sunt vacante și în baza unei note de fundamentare în care se propune scoaterea la concurs a postului.
(2) Un post se consideră vacant dacă este prevăzut astfel în statul de funcţii întocmit anual sau dacă este vacantat pe parcursul anului.
(3) Postul se vacantează prin una dintre următoarele modalităţi:
a. încetarea contractului individual de muncă al persoanei care ocupă postul, în condiţiile legii;
b. trecerea persoanei care ocupă postul pe un alt post din cadrul aceleiaşi organizaţii de cercetare, ca urmare a câştigării unui concurs;
c. prin suspendarea contractului individual de muncă al persoanei care ocupă postul, în acest caz, postul temporar vacant putând fi ocupat pe perioadă determinată până la revenirea titularului pe postul respectiv.

Articolul 12. Procedura de concurs este demarată de către IBPC-NS numai după aprobarea organizării concursului de către Consiliul Științific.

Articolul 13. Calendarul de derulare a concursurilor pentru ocuparea posturilor vacante:
a. se întocmește nota de fundamentare prin care se propune scoaterea la concurs a postului și se înaintează spre aprobare Consiliului Științific al IBPC-NS;
b. după primirea aprobării, concursul se anunță public, prin afișare pe site-ul IBPC-NS și prin publicare pe https://posturi.gov.ro/.ro;

c. se stabilește componența comisiei de concurs/soluționare a contestațiilor în termen de 5 zile de la aprobarea organizării concursului și a calendarului de desfășurare și se întocmesc deciziile de numire a membrilor și de desemnare a președinților de comisie;
d. intervalul disponibil pentru depunerea dosarului de concurs este de 30 zile (pentru posturile pe perioadă nedeterminată) de la data publicării anunțului;
e. dosarele de concurs se transmit președintelui comisiei de concurs;
f. sunt admiși și pot fi recomandați candidații care au obținut cel puțin media 8 și nici o nota sub 7;
g. în termen de 1 zi lucrătoare de la data publicării rezultatului concursului, candidații au dreptul să depună contestație;
h. contestațiile se soluționează în termen de 2 zile lucrătoare de la înregistrarea lor;
i. raportul final al concursului, după aprobarea de către Consiliul Științific, este înaintat către Director;
j. în termen de 2 zile lucrătoare de la finalizarea concursului se publică rezultatul final al concursului;
k. dosarele de concurs câștigătoare sunt înaintate Secției de Științe Biologice în termen de 10 zile calendaristice de la finalizarea concursului;
l. procedura de concurs trebuie finalizată de comisie în cel mult 15 zile de la data încheierii înscrierilor, iar raportul final și dosarul complet trebuie depuse la Prezidiul Academiei Române în maximum 45 de zile de la aceeași dată.

Capitolul IV. Publicarea anunțului privind organizarea concursului

Articolul 14. Concursul se anunţă public prin afișare la sediul IBPC-NS, pe pagina de internet a IBPC-NS (www.icbp.ro) și pe site-ul https://posturi.gov.ro/.ro, putând fi distribuit și pe alte platforme online naționale si internaționale, sau în forma printată în diverse locații pentru a vizibilitate crescută. Toate anunțurile conțin elemente referitoare la data-limita pâna la care se pot depune dosarele, pagina de internet a IBPC-NS și datele de contact ale secretariatului IBPC-NS, de unde pot fi obținute eventuale informații suplimentare referitoate la concurs.

Articolul 15. Simultan cu publicarea anunţului de concurs, pe site-ul IBPC-NS se publică şi formularele-tip (cererea pentru înscrierea la concurs, Anexa 1A, propunerea de dezvoltare a carierei științifice, Anexa 5 și fișele de verificare a îndeplinirii standardelor proprii organizației de cercetare, Anexele 5A, 5A.1-5A.3 și 5Aa) și următoarele elemente:
a. scurtă descriere a postului pentru care se organizează concurs (poziția, codul COR, durata contractului individual de muncă, atribuţii specifice);
b. salariul minim de încadrare corespunzător postului;
c. tematica şi bibliografia probelor de concurs;
d. lista completă a documentelor ce alcătuiesc dosarul de concurs;
e. adresa la care se poate transmite dosarul de concurs (în format fizic sau electronic);

f. modul de organizare al concursului (poba scrisă și/sau orală);
g. ziua, ora și locul desfăşurării concursului;
h. calendarul/descrierea procedurii concursului.

Capitolul V. Înscrierea la concurs

Articolul 16. Înscrierera la concurs se face în termen de 30 de zile calendaristice de la data publicării anunţului, prin depunerea de către candidat a unui dosar atât în format fizic, la sediul IBPC-NS, cât și în format electronic (pe memory stick la sediul IBPC-NS și la adresa de e-mail indicată în anunț).

Articolul 17. Dosarul trebuie să conțină următoarele documente prevăzute și în Anexa DA (fiecare document din dosarul fizic va fi scanat conform unui opis, Anexa 6A și salvat pe un memory stick):

a. cererea de înscriere la concurs semnată, la care se anexează o declaraţie pe propria răspundere prin care candidatul atestă veridicitatea informaţiilor prezentate în dosar (Anexa 1A și Anexa 3A);
b. propunerea de dezvoltare a carierei ştiinţifice din punctul de vedere al activităţilor de cercetare ştiinţifică (Anexa 5), de maximum 5 pagini, semnată (pentru CSI, CSII, CSIII);
c. curriculum-ul vitae după model EUROPASS semnat de către candidat (Anexa 3), obligatoriu să conțină: i. studiile efectuate şi diplomele obţinute; ii. experienţa profesională şi locurile de muncă relevante ocupate anterior; iii. proiectele de cercetare, dezvoltare şi inovare pe care le-a condus ca director de proiect şi granturile obţinute, dacă este cazul, indicându-se pentru fiecare sursa de finanţare, volumul finanţării şi principalele publicaţii sau brevete de invenţie rezultate; iv. premiile sau alte elemente de recunoaştere a contribuţiilor ştiinţifice; v. descrierea narativă a celor mai importante 3 realizări de la ultima promovare-maximum 3 pagini;
d. lista publicaţiilor, lucrărilor, articolelor/studiilor, brevetelor de invenţie selectate de candidat în funcţie de relevanţa pentru activităţile de cercetare ştiinţifică proprii, semnate în original de către candidat (Anexa 4). Lista trebuie să conțină obligatoriu: i. lista a cel mult 10 publicaţii ştiinţifice, cele mai relevante, precum: cărţi de autor, articole/studii/capitole, volume editate, lucrări; ii. lista brevetelor de invenţie şi a altor titluri de proprietate industrială; iii. lista cărţilor de autor şi a volumelor editate şi publicate; iv. lista articolelor/studiilor in extenso, publicate în reviste din fluxul ştiinţific internaţional principal; v. lista altor lucrări şi contribuţii ştiinţifice;
e. fişa de verificare a îndeplinirii standardelor proprii ale organizaţiei de cercetare, completată şi semnată de către candidat (Anexele 5A), cu excepţia situaţiei reglementate la lit. f;
f. dovada deţinerii gradului profesional de cercetare-dezvoltare corespunzător postului pentru care candidează, fişa de verificare a îndeplinirii standardelor proprii ale organizaţiei de cercetare, completată şi semnată de către candidat, doar pentru candidaţii care deţin gradul profesional de cercetare-dezvoltare de CS II sau CS I corespunzător postului pentru care

candidează;

g. copia diplomei de licenţă sau echivalentă/masterat/doctorat, după caz. În situaţia în care candidatul declarat câştigător nu deţine o diplomă eliberată de o instituţie de învăţământ superior din România, acesta trebuie să depună o copie conform cu originalul a atestatului de recunoaştere sau de echivalare a acesteia înainte de încadrarea pe post şi semnarea contractului individual de muncă, sub sancţiunea neemiterii actului administrativ de încadrare pe post;
h. copia actului de identitate sau orice alt document care atestă identitatea, potrivit legii, după caz, certificată de către candidat conform cu originalul, numele în clar și semnătura;
i. copia certificatului de căsătorie sau dovada schimbării numelui, după caz, certificată de către candidat conform cu originalul, numele în clar și semnătura;
j. certificatul medical care să ateste starea de sănătate corespunzătoare, eliberată de către medicul de familie al candidatului sau de către unităţile sanitare abilitate cu cel mult 3 luni anterior derulării concursului;
k. declaraţia de consimţământ pentru prelucrarea datelor cu caracter personal semnată (Anexa 4A);
l. certificatul de cazier judiciar;
m. certificatul de naștere, certificat de către candidat conform cu originalul, numele în clar și semnătura.

Dosarul de concurs pentru ocuparea postului de CSI, CSII se constituie din 2 părți (dosarul administrativ și mapa cu lucrări științifice), iar documentelelor conținute (conform anexei DA) li se va atribui câte un link conform pașilor procedurali din Anexa L.

Articolul 18. Secretarul comisiei de concurs înregistrează dosarul de concurs, comunică numărul de înregistrare candidatului şi transmite dosarul membrilor comisiei de concurs, în condiţiile stabilite prin regulamentul propriu de concurs.

Articolul 19. Secretarul comisiei de concurs verifică dacă dosarul de concurs este complet în ziua primirii şi înregistrării acestuia. În situaţia în care dosarul de concurs este incomplet, secretarul comisiei de concurs solicită candidatului clarificări, iar acesta poate completa dosarul de concurs până la data la care expiră perioada de depunere a dosarelor de concurs.

Articolul 20. În exercitarea atribuţiilor prevăzute la artic. 18 și 19, secretarul comisiei de concurs colaborează cu responsabilul de resurse umane, în condiţiile prevăzute în regulamentul propriu de concurs.

Capitolul VI. Comisia de concurs şi comisia de soluţionarea a contestaţiilor

Articolul 21. În termen de 5 zile de la aprobarea organizării concursului şi a calendarului de desfăşurare, se stabilește componența nominală a comisiei de concurs și a celei de soluționare a contestațiilor, pentru fiecare post vacant pentru care se organizează concurs, ca urmare a propunerilor

directorului/secretarului științific, aprobării în Consiliul Științific al IBPC-NS și avizării de către Secția de Științe Biologice a Academiei Române.

Articolul 22.
(1) Membrii comisiei de concurs și cei ai comisiei de soluționare a contestațiilor sunt cercetători științifici sau cadre didactice universitare cu gradul profesional sau titlul didactic universitar cel puțin egal cu gradul profesional pentru care se organizează concursul și sunt specialiști în domeniul disciplinelor postului vacant sau în domenii apropiate.
(2) Membrii comisiei de concurs nu pot face parte din comisia de soluţionare a contestaţiilor.
(3) Sunt implicate în procedura de concurs persoanele care:
a. participă în procesul de decizie referitor la numirea comisiei de concurs şi a comisiei de soluţionare a contestaţiilor;
b. participă la evaluarea profesională sau administrativă în cadrul concursului.
(4) Nu pot fi implicate în procedura de concurs persoanele care au calitatea de soţ/soţie, rudă sau afin până la gradul al III-lea inclusiv în raport cu candidatul la concursul pentru ocuparea unui post vacant de cercetare.

Articolul 23. Componența comisiei de concurs se numește prin act administrativ al directorului IBPC-NS și este alcătuită:
a. din 3 membri, în cazul concursului pentru ACS, CS și CSIII;
b. din 5 membri, din care cel puțin 3 sunt din afara IBPC-NS, pentru CSII și CSI.

Articolul 24. Componența comisiei de soluționare a contestațiilor se numește prin act administrativ al directorului IBPC-NS și este alcătuită din 3 membri.

Articolul 25. Lucrările comisiei de concurs și ale celei de soluționare a contestațiilor sunt conduse de unul dintre cei doi membri fiecărei comisii în parte, cu afiliere la IBPC-NS, în calitate de președinte, numit prin decizie de către Directorul IBPC-NS.

Articolul 26. Comisia de concurs şi comisia de soluţionare a contestaţiilor beneficiază de suport administrativ din partea IBPC-NS, asigurat de un secretar numit prin act administrativ al Directorului, care nu este membru al comisiei de concurs şi nu ia parte la deciziile comisiei.

Articolul 27. În situaţii bine justificate, imbolnavire, deplasare internă/externă (interes de serviciu), cel mult un membru al comisiei de concurs poate participa în sistem de videoconferinţă online. Înregistrarea ședinței va face parte din dosarul de concurs.

Articolul 28. Deciziile comisiei de concurs și cele ale comisiei de soluționare a contestațiilor se iau prin votul deschis al membrilor şi trebuie să întrunească votul favorabil a cel puțin jumătate plus unu din numărul membrilor componenți.

VII. Evaluarea concursului

Articolul 29. Concursul constă în evaluarea activităţii ştiinţifice şi a competenţelor privind cercetarea ale candidaţilor pentru posturile vacante scoase la concurs, conform criteriilor de evaluare și a grilelor proprii de notare stabilite intern și aprobate de Consiliul Științific al IBPC-NS (Anexa SC.C și Anexa GN).

Articolul 30. Concursul pentru ocuparea posturilor vacante de ACS şi CS constă în *probe scrise, orale şi/sau practice şi de dosar,* specifice postului și se evaluează după cum urmează:

a. rezultatul probelor de concurs se apreciază de fiecare membru al comisiei de concurs prin note de la 1.00 la 10.00;
b. nota fiecărei probe de concurs reprezintă media aritmetică a notelor acordate de fiecare membru al comisiei de concurs;
c. punctajul final reprezintă media aritmetică a notelor probelor de concurs;
d. un candidat poate fi declarat câştigător numai dacă a obţinut punctajul final cel puţin 8.00 şi nicio notă sub 7.00 la probele de concurs;
e. Consiliul Științific analizează respectarea procedurilor stabilite prin regulamentul propriu de concurs şi aprobă raportul asupra concursului prin vot nominal deschis;
f. ponderea probelor de concurs în rezultatul final se calculează după cum urmează:
    i) pentru ACS: proba scrisă (50%), proba orală (50%)
    ii) pentru CS: evaluare dosar (33,3%), proba scrisă (33,3%), proba orală (33,3%)

Articolul 31. Concursul pentru ocuparea posturilor vacante de CSIII, CSII şi CSI constă în *analiza dosarului de înscriere la concurs* şi acordarea punctajului, pe baza unei grile adaptate specificului activităţii locului de muncă al candidatului şi a performanţelor sale, putând *include şi o probă de interviu*. Procesul de evaluare se desfăşoară după cum urmează:

a. după analiza dosarului de concurs, fiecare membru al comisiei de concurs acordă un punctaj, pe baza unei grile adaptate specificului activităţii locului de muncă a candidatului, în acord cu pragurile stabilite prin standardele minimale şi prin standardele proprii ale organizaţie de cercetare, după caz;
b. punctajul individual acordat de un membru al comisiei de concurs reprezintă suma punctajelor obţinute de candidat, aferentă fiecărui prag cantitativ din standardele proprii ale organizaţiei de cercetare.
c. punctajul total reprezintă media aritmetică a punctajelor individuale acordate de membrii comisiei;
d. în cazul în care concursul include şi o probă de interviu, se acordă un punctaj care reprezintă media aritmetică a punctajelor acordate de membrii comisiei;
e. punctajul maxim al probei interviu nu poate depăşi 20% din punctajul total calculat;
f. punctajul final reprezintă suma punctajelor acordate în urma analizării dosarului și a interviului;
g. Consiliul Ştiinţific analizează respectarea procedurilor stabilite prin regulamentul propriu de

concurs şi aprobă raportul asupra concursului, prin vot nominal deschis;

h. ponderea probelor de concurs în rezultatul final se calculează după cum urmează:
   i) pentru CSIII: evaluare dosar (80%) și proba interviu (20%);
   ii) pentru CSI și CSII: evaluare dosar (100%).

Articolul 32. Rezultatul concursului este analizat și aprobat de Consiliul Științific al IBPC-NS, punctajul final fiind calculat conform formulelor:

a. pentru ACS: Pfinal = (Pscris + Poral)/2;
b. pentru CS: Pfinal = (Pscris + Poral + Pdosar)/3;
c. pentru CSIII: Pfinal = Pdosar × 80% + Pinterviu × 20%;
d. pentru CSII și CSI: Pfinal = Pdosar.

Articolul 33. În cazul în care concursul include probe scrise, orale şi/sau practice, respectiv interviu, comisia de concurs evaluează candidatul din perspectiva următoarelor criterii necumulative:

a. relevanţa rezultatelor activităţii de cercetare şi/sau inovare, în relaţie cu tematica postului pentru care candidează;
b. impactul activităţii de cercetare şi/sau inovare şi al rezultatelor ştiinţifice ale candidatului, în relaţie cu tematica postului pentru care candidează, reflectat în publicaţii ştiinţifice;
c. anvergura internaţională a activităţilor, reflectată în publicaţii ştiinţifice, brevete de invenţie, participări la conferinţe ştiinţifice, colaborări individuale şi instituţionale, proiecte, burse prestigioase, calitatea de profesor/cercetător invitat, de membru în colegiile de redacţie ale unor reviste de top din domeniu;
d. capacitatea de a atrage fonduri de cercetare sau de a colabora cu organizaţii publice şi/sau private de cercetare şi de a conduce proiecte de cercetare-dezvoltare;
e. prestigiul profesional;
f. capacitatea organizatorică;
g. capacitatea de a îndruma tineri cercetători sau studenţi;
h. capacitatea de a transfera cunoştinţele şi rezultatele către mediul economic sau social ori de a populariza propriile rezultate ştiinţifice;
i. capacitatea de a lucra în echipă şi eficienţa colaborărilor ştiinţifice ale acestuia, în funcţie de specificul domeniului candidatului;
j. experienţa profesională în alte instituţii decât instituţia organizatoare de concurs.

Capitolul VIII. Rezultatele concursului

Articolul 34.

(1) În urma finalizării procesului de evaluare, comisia de concurs stabileşte, pentru fiecare post, ierarhia candidaţilor şi nominalizează candidatul care a obţinut cele mai bune rezultate în raport cu punctajul final calculat.

(2) Preşedintele comisiei de concurs întocmeşte un raport asupra concursului (Anexa 3C), semnat de fiecare membru al comisiei și realizat pe baza referatelor de apreciere (Anexa 2C) redactate de

fiecare membru al comisiei de concurs şi cu respectarea ierarhiei candidaţilor decise de comisia de concurs.
(3) Consiliului Ştiinţific, în urma analizei raportul și documentației aferente primite de la președintele comisiei de concurs, verifică respectarea procedurilor stabilite prin regulamentul propriu de concurs şi aprobă sau nu raportul asupra concursului, prin vot nominal deschis. Consiliul Științific nu poate modifica ierarhia candidaţilor rezultată în urma evaluării realizate de comisia de concurs.
(4) După avizarea dosarelor și aprobarea raportului comisiei de concurs de către Consiliul Științific, acesta este înaintat Directorului IBPC-NS.

Articolul 35.
(1) Dosarele de concurs pentru obținerea gradelor de ACS, CS, CSIII, CSII şi CSI se depun de către IBPC-NS în termen de 10 zile calendaristice de la finalizarea concursului la Secția de Științe Biologice, care în termen de maximum 15 zile calendaristice, va analiza dosarul pentru conferirea gradului profesional de cercetare-dezvoltare. În cazul avizării favorabile, va înainta spre verificare dosarul Serviciului Juridic și Comunicare.
(2) Serviciul Juridic și Comunicare va aviza dosarul privind legalitatea desfășurării concursului în termen de maximum 15 zile calendaristice de la primirea dosarului de la Secția de Științe Biologice. În cazul avizării favorabile, va înainta dosarul Serviciului Programe de Cercetare și Doctorat.
(3) Serviciul Programe de Cercetare și Doctorat va înainta spre aprobare Prezidiului Academiei Române, în termen de maximum 5 zile calendaristice, dosarele de concurs care au obținut avizului favorabil al Secției de Științe Biologice și al Serviciului Juridic și Comunicare.
(4) După aprobarea rezultatelor examenului de promovare de către Prezidiul Academiei Române, dosarele se restituie IBPC-NS.

Articolul 36.
(1) În situaţia în care, în urma analizei administrative, se constată că dosarul de concurs este incomplet ori nu respectă reglementările legale în vigoare, precum şi prevederile regulamentului propriu de concurs al institutului, se returnează dosarul de concurs la IBPC-NS.
(2) În termen de 15 zile de la data restituirii, IBPC-NS are obligaţia actualizării acestuia, astfel încât să fie respectate prevederile legale şi să îl retrimită către Secția de Științe Biologice/Serviciul care a constatat nerespectarea reglementărilor legale în vigoare.
(3) Dacă nu este posibilă completarea dosarului candidatului declarat câştigător, astfel încât să respecte reglementările legale în vigoare, precum şi prevederile regulamentului IBPC-NS, candidatul de pe locul imediat următor este declarat câştigător, iar dosarul acestuia se transmite către Secția de Științe Biologice/Serviciul care a constatat nerespectarea reglementărilor legale în vigoare, în vederea analizei administrative, cu respectarea prevederilor alin. (1).
(4) În cazul în care nu mai există niciun candidat care să îndeplinească condiţiile, concursul se reia fără a mai fi necesară o nouă aprobare în vederea organizării acestuia.

Articolul 37.
(1) Durata și finalizarea concursului este de 15 zile calendaristice de la data încheierii înscrierii la concurs, la nivelul comisiei de concurs și de 45 de zile calendaristice până la depunerea raportului comisiei de concurs și a dosarului ce conține documentele aferente concursului către Prezidiul Academiei Române.
(2) Rezultatul concursului se afișează la sediul IBPC-NS şi pe site-ul acestuia, în termen de 2 zile lucrătoare de la finalizarea concursului.

Articolul 38.
(1) Candidații la concurs nemulțumiți de decizie, pot formula contestații în termen de 1 zi lucrătoare de la data publicării rezultatului concursului, care vor fi depuse la aceeași adresă de e-mail din anunț.
(2) Secretarul comisiei înaintează contestațiile comisiei de soluționare a contestațiilor, care le va soluționa în termen de 2 zile lucrătoare de la înregistrarea lor.
(3) Preşedintele comisiei de soluționarea contestațiilor întocmește un raport asupra contestațiilor (Anexa 3C) depuse, semnat de către fiecare membru al comisiei și realizat pe baza referatelor redactate (Anexa 2C) de către aceștia.
(4) Consiliului Ştiinţific, în urma analizei raportul și documentației aferente primite de la președintele comisiei de soluționare a contestațiilor, aprobă sau infirmă raportul asupra contestațiilor depuse, care în final este înaintat Directorului IBPC-NS.
(5) Rezultatele finale ale concursului sunt afișate și în termen de 5 zile lucrătoare de la afișare, trebuie să fie publicate pe site-ul institutului alaturi de CV-ul, Fișa de verificare a îndeplinirii standardelor proprii institutului și de Lista publicațiilor științifice ale candidatului declarat admis.
(6) În cazul în care postul vacant pentru care se organizează concursul nu a fost ocupat, concursul poate fi reluat, cu respectarea legislaţiei în vigoare.

Capitolul IX. Încadrarea pe post

Articolul 39. Gradele profesionale de ACS, CS, CSIII, CSII și CSI din IBPC-NS sunt acordate prin decizie a președintelui Academiei Române, în urma aprobării rezultatelor concursului public de către Prezidiul Academiei Române.

Articolul 40. IBPC-NS întocmește un raport sintetic (Anexa 7) privind organizarea și desfășurarea concursului, care se transmite anual, în termen de 15 zile calendaristice de la finalul anului calendaristic pentru care se face raportarea, atât în format fizic cu adresa de înaintare, către Serviciul Programe de Cercetare și Doctorat, cât și în format electronic la adresa de email bpg@acad.ro.

Articolul 41. Încadrarea pe posturi corespunzătoare funcțiilor și gradelor profesionale ale personalului CDI se realizează conform principiului meritului profesional, în baza unor proceduri

transparente și echitabile care respectă principiile generale și condițiile prevăzute de Carta Europeană a Cercetătorilor.

Articolul 42. Datele cu caracter personal ale persoanelor implicate în procesul de examinare sunt prelucrate în cadrul platformei informatice, cu respectarea prevederilor Regulamentului (UE) 2016/679 privind protecţia persoanelor fizice în ceea ce priveşte prelucrarea datelor cu caracter personal şi privind libera circulaţie a acestor date şi de abrogare a Directivei 95/46/CE (Regulamentul general privind protecţia datelor).

Articolul 43. Anexele SC.C, DA, L, 1-5GN, 1A-6A, 1C-4C, 1-9, 1.1C-1.3C, 2.1C și 2.2, fac parte din prezentul Regulament și împreună cu acesta, au fost stabilite și întocmite de către IBPC-NS în conformitate cu reglementările și modelele propuse de către Academia Română în cadrul Normelor metodologice privind organizarea concursului pentru ocuparea pozițiilor vacante de CDI din institutele Academiei Române/15 iulie 2025. Acestea reprezintă singurele documente recomandate pentru a fi utilizate în desfășurarea concursului, fiind puse la dispoziția întregului personal implicat în procedura de concurs, prin intermediul site-ului oficial al IBPC-NS și al partiției comune pe intranetul instituției.

Prezentul regulament, în forma sa revizuită, aprobat în ședința Consiliului Științific al IBPC-NS din la data de 13.01.2026, înlocuiește vechiul Regulament din data de 6.10.2025. În continuare, prezentul regulament poate fi ajustat prin calibrarea oferită de concursurile pentru fiecare categorie (grad științific) care se vor desfășura în continuare.

REGULAMENT PRIVIND ORGANIZAREA ŞI DESFĂȘURAREA CONCURSULUI DE ADMITERE LA STUDIILE UNIVERSITARE DE DOCTORAT

Metodologia organizării şi desfăşurării concursului de admitere la studiile universitare de doctorat

I. Norme de organizare

Concursul de admitere la studiile universitare de doctorat din anul 2026 pentru toate domeniile de doctorat din cadrul fiecărei Școli doctorale din cadrul Școlii de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR) se va desfășura conform legislaţiei în vigoare:

- ***Legea învăţământului superior nr. 199/2023 din 4 iulie 2023cu modificările și completările ulterioare;***
- ***Regulamentul - cadru privind studiile universitare de doctorat nr. 3.020/08.01.2024;***
- ***Ordinul Nr. 3693/2024 din 1 februarie 2024 pentru aprobarea Metodologiei-cadru privind organizarea admiterii în învăţământul superior în ciclurile de studii universitare de scurtă durată, de licenţă, de master şi de doctorat***

Concursul de admitere la doctorat se organizează de către Academia Română prin Școala de Studii Avansate a Academiei Române, abilitată să organizeze doctorate.

Concursul pentru admiterea la studiile universitare de doctorat se poate organiza, de regulă, în sesiunea din septembrie sau în două sesiuni, pentru școlile doctorale care consideră necesar acest demers, cu respectarea legislației în vigoare, în condiţii identice, înainte de începerea anului universitar, dar nu mai târziu de 30 septembrie. Locurile neocupate în prima sesiune vor fi reportate pentru sesiunea a 2-a, în condiţiile

Aceste informații vor fi aduse la cunoştinţă celor interesaţi prin afişare sau postarea pe pagina web. Studiile universitare de doctorat se organizează în general la forma cu frecvență, şi, în funcţie de opţiunile şi strategia fiecărei şcoli, cu frecvenţă redusă cu taxă.

II. Calendarul admiterii

Înscrierile şi concursul de admitere la studiile universitare de doctorat se desfășoară conform calendarului de desfășurare a concursului de admitere la doctorat, anexă la prezentul regulament.

Înscrierile la colocviul de admitere se vor face de regulă, în luna septembrie la institutele afiliate Școlilor doctorale. Colocviul de admitere la doctorat se va desfăşura în luna septembrie.

În cazul în care va exista și o altă sesiune de admitere, calendarul admiterii va fi stabilit de fiecare școală doctorală în parte, cu respectarea legislației în vigoare.

III. Pregătirea desfăşurării concursului de admitere

În vederea organizării concursului de admitere la doctorat, Școlile doctorale transmit către SCOSAAR situația cu numărul de locuri solicitate de către fiecare conducator de doctorat.

Consiliul Științific SCOSAAR (CSUD) analizează solicitările conducătorilor de doctorat privind numărul de locuri vacante finanțate. În această privință, se va ține cont de cerințele unei încărcări echilibrate pentru fiecare conducător de doctorat în vederea asigurării calității studiilor universitare de doctorat. Numărul maxim de locuri acordate unui conducător de doctorat este de 8. De asemenea, evaluarea presupune cunoașterea activității conducătorului de doctorat, ținând cont și de titlurile de doctor obținute de către studenții de doctorat coordonați.

Consiliul Științific SCOSAAR (CSUD) înaintează spre aprobare Prezidiului Academiei Române lista locurilor finanțate cu bursă sau finanțate fără bursă per conducător de doctorat/institut.

De asemenea, conducătorul de doctorat propune/nominalizează comisia de îndrumare și integritate academică. Componența comisiei de îndrumare și intergitate academică este aprobată prin decizie semnată de către directorul SD.

Conducătorii de doctorat transmit institutelor de cercetare ale Academiei Române tematicile și bibliografia aferentă colocviului de admitere în vederea afișării pe pagina web a institutelor.

Școlile doctorale primesc de la institutele afiliate tematicile și bibliografia aferentă colocviului de admitere și le transmit către SCOSAAR în vederea afișării pe pagina web a SCOSAAR

Școlile doctorale elaborează şi adoptă regulamente proprii de admitere, care apoi vor fi supuse aprobării CSD, Directorului şcolii respective și CSUD. Aceste regulamente vor trebui să cuprindă:

- Forma de desfăşurare a concursului de admitere, inclusiv structura probelor din cadrul acestuia şi organizarea a una sau mai multe comisii sau subcomisii de admitere;
- Tematica concursului de admitere şi bibliografia comună, dacă este cazul;
- Criteriile de evaluare şi criterii de departajare a candidaţilor;
- Pentru institutele de cercetare care organizează admiterea cu ajutorul mai multor comisii sau subcomisii, se va prevedea explicit modul în care se va realiza clasificarea tuturor candidaţilor dintr-un domeniu de doctorat pe o listă unică, în ordinea descrescătoare a mediilor generale obţinute de candidaţi, în vederea alocării locurilor cu bursă/stipendium.
- Modul de soluţionare a contestaţiilor la probele scrise, dacă este cazul;

După aprobare, aceste regulamente se afișează pe pagina web a institutelor de cercetare unde se desfășoară concursul de admitere la doctorat.

Regulamentele proprii de admitere pot prevedea posibilitatea susţinerii online a concursului de admitere.

Școlile doctorale vor desemna comisiile de admitere şi, după caz, comisiile de soluţionare a contestaţiilor.

IV. Condiţii generale de înscriere la concurs

Înscrierea la concursul de admitere se face personal de către candidat sau de către altă persoană cu procură notarială pe baza actului de identitate.

Cu ocazia înscrierii la concursul de admitere, candidatul la studiile universitare de doctorat își alege un conducător de doctorat dintre acei conducători de doctorat ai Școlii doctorale unde dorește să studieze și care are locuri vacante pentru concursul de admitere.

Înscrierea la concursul de admitere la studii universitare de doctorat în cadrul institutului unde se organizează admiterea la studiile universitare de doctorat nu este condiţionată de domeniul în care a fost dobândită diploma de licenţă sau masterat.

La colocviul de admitere la doctorat se pot prezenta absolvenţi ai studiilor universitare de masterat, dar şi absolvenţii cu diplomă de licenţă sau echivalentă (diploma de licenţă a absolvenţilor unor programe de studii de 5 sau 6 ani, forma de învăţământ "zi" - învăţământ de lungă durată), eliberată, de regulă, până în anul absolvirii primei promoţii de licenţă organizate în conformitate cu

prevederile Legii nr. 288/2004 privind organizarea studiilor universitare, cu modificările şi completările ulterioare.

La admiterea la studii universitare de doctorat se pot înscrie şi cetăţeni care nu fac parte din Uniunea Europeană, Spaţiul Economic European şi Confederaţia Elveţiană (extracomunitari). Recunoaşterea studiilor efectuate de către aceştia în afara României se va realiza de către direcţia de specialitate din cadrul Ministerului Educaţiei.

Admiterea românilor de pretutindeni, precum şi a cetăţenilor din state terţe Uniunii Europene se realizează în baza metodologiilor special elaborate de către Ministerul Educaţiei.

Durata totală cumulată a ciclului de studii universitare de licenţă şi masterat trebuie să fie de cel puţin 300 de credite transferabile (ECTS).

La înscriere se vor depune copii conform cu originalul după documentele solicitate; certificarea conformității cu originalul se face de către persoana/persoanele care are/au atribuţii desemnate în acest sens.

Prin excepţie, pe perioada instituirii stării de alertă, necesitate sau de urgenţă, în baza autonomiei universitare, se poate realiza înscrierea online prin încărcarea documentelor de către candidaţi cu asumarea responsabilităţii de către aceştia cu privire la autenticitatea şi corespondenţa dintre documentele digitale/scanate şi cele originale.

Înscrierile se vor face la institutele de cercetare afiliate Școlilor doctorale care organizează concurs de admitere la doctorat.

Pentru înscriere la colocviul de admitere la doctorat, candidaţii vor prezenta următoarele documente:

- cerere de înscriere – formular tip (Anexa 1);
- certificat de naştere, copie;
- certificat de căsătorie sau alt act de schimbare a numelui, copie;
- diplomă de bacalaureat, copie;
- diplomă de licenţă şi foaie matricolă, copie;
- diploma de master şi foaie matricolă, copie;
- cartea de identitate/pașaport, copie;
- atestat de susţinere a unui examen de competenţă lingvistică (nivelul minim B2, conform cadrului de referinţă al Consiliului Europei) , copie;
- alte certificate care atestă pregătire universitară şi /sau postuniversitară în domeniu, copie;
- curriculum vitae - model european (Partea a I - a:CV, Partea a II - a descrierea activităţii ştiinţifice);
- lista lucrărilor ştiinţifice publicate în domeniul de studiu ales;
- lista bibliografică cu literatura de specialitate studiată pentru colocviul de admitere;
- fişa de înscriere - formular tip (Anexa 2);
- propunere privind teza de doctorat ce urmează a fi elaborată şi o scurtă prezentare a acesteia -1, 2 pagini - formular tip (Anexa 3);
- adeverinţă de salariat în cazul in care candidatul este angajat;
- în cazul studiilor doctorale cu predare în limba română, pentru cetăţenii străini – certificatul de competenţă lingvistică privind cunoaşterea limbii române/sau să depună certificate/diplome care să dovedească parcurgerea a cel puțin 4 ani consecutivi de studii în România

Absolvenţii de studii universitare de masterat, promoţia anului în curs, pot depune la dosar adeverinţa de absolvire a studiilor universitare de masterat.

Candidaţii care au efectuat studiile în străinătate au obligaţia de a prezenta la înscriere traducerea diplomei obţinute şi a atestatului de recunoaştere a acestor studii eliberat de către direcţia de specialitate din cadrul Ministerului Educaţiei

Dosarele incomplete nu sunt acceptate la înscriere.

După încheierea perioadei de înscriere la concursul de admitere și până la concurs, opţiunea privind conducătorul de doctorat, tema de doctorat, precum şi alte informaţii, nu pot fi modificate.

Redistribuire locuri aprobate pentru admiterea la doctorat

A. Măsuri aplicabile înaintea examenului de admitere

Conducătorii de doctorat abilitați și afiliați unei școli doctorale în cadrul SCOSAAR ulterior procesului de aprobare a locurilor solicitate la doctorat precum și cei care constată necesitatea suplimentării numărului de locuri sau doresc să renunțe la locurile aprobate **îi** vor înștiința **cu privire la actualizarea numărului de locuri,** printr-o solicitare scrisă, **pe responsabilii de studii doctorale** ai institutelor. Responsabilii vor centraliza aceste informări și vor transmite Școlii Doctorale lista finală care cuprinde necesarul actualizat de locuri pentru admiterea la doctorat, precum și locurile rămase disponibile pentru redistribuire.

În vederea soluționării solicitărilor, înainte de începerea examenului de admitere, fiecare Școală Doctorală va analiza listele transmise de institute și va centraliza locurile rămase disponibile pentru redistribuire ca urmare a renunțării conducătorilor de doctorat la locurile aprobate.

Școala Doctorală va transmite către SCOSAAR lista actualizată de locuri pentru admiterea la doctorat.

Locurile disponibile vor fi redistribuite (**sau pot rămâne la această fază a procesului de admitere**) cu prioritate în cadrul aceleiași Școli Doctorale.

Dacă rămân locuri disponibile și după redistribuirea locurilor în cadrul fiecărei școli doctorale, directorul SCOSAAR poate decide repartizarea locurilor neocupate către școlile interesate de locuri suplimentare.

Pentru locurile devenite disponibile în urma redistribuirii au prioritate, în următoarea ordine, membrii Academiei Române, cercetătorii științifici CSI, cercetătorii științifici CSII, având în vedere totodată vechimea în activitatea doctorală, numărul studenților doctoranzi îndrumați care au obținut titlul de doctor.

Redistribuirea locurilor se va realiza cu respectarea limitei maxime de 8 doctoranzi/conducător de doctorat, iar locurile astfel redistribuite vor fi supuse avizării CSUD și aprobării Prezidiului Academiei Române.

Pentru a putea fi aplicabilă redistribuirea descrisă mai sus, fiecare şcoală doctorală va înainta spre completare conducătorilor de doctorate, înainte de fiecare sesiune de admitere, un document-declaraţie privind statutul de conducător de doctorat (*Formular de declarare a statutului conducătorului de doctorat, ANEXA la Regulamentul Școlii Doctorale de ..... din cadrul SCOSAAR*), care trebuie să conţină: 1. calitatea de membru al Academiei Române (nu este membru, este membru corespondent sau membru titluar); 2. funcţia şi statutul exact de conducător (gradul de cercetare şi dacă este doar abilitat sau conduce efectiv doctorate – are întâietate calitatea de conducător efectiv); 3. numărul de ani de experienţă (în calitate de abilitat/conducător de doctorate – are prioritate calitatea de conducător efectiv), numărul de doctoranzi coordonaţi care au obţinut deja titlul de doctor.

B. Măsuri aplicabile după finalizarea examenului de admitere

[redundant-scos/fără sens: Locurile neocupate în urma concursului pot fi repartizate înaintea începerii anului universitar, de la un conducător de doctorat la altul, cu acordul scris al celor implicaţi şi cu aprobarea directorului şcolii doctorale din care fac parte și a directorului SCOSAAR.]

În situația în care un candidat a parcurs integral etapele examenului de admitere, însă, din motive obiective și temeinic justificate, conducătorul de doctorat inițial nu poate asigura coordonarea acestuia, Școala Doctorală poate propune înmatricularea candidatului sub îndrumarea unui alt conducător de doctorat din cadrul aceleiași școli. Această măsură este permisă doar în situația în care noul conducător de doctorat dispune de locuri neocupate sau a solicitat suplimentarea acestora, sau nu are locuri neocupate (nou afiliat etc.) dar a formulat o cerere expresă (aprobată de directorul şcolii doctorale) în timpul examenului de admitere pentru a primi locul ocupat deja de doctorandul admis pe care îl va coordona, cu respectarea limitei maxime de 8 doctoranzi/conducător și cu condiția corelării tematicii propuse de candidat cu domeniul de expertiză al conducătorului desemnat.
Dacă rămân locuri disponibile și după concursul de admitere în cadrul fiecărei școli doctorale, directorul SCOSAAR poate decide repartizarea locurilor neocupate către școlile interesate de locuri suplimentare. Redistribuirea se va face în funcție de notele obținute de către candidați și de solicitările conducătorilor de doctorat cu respectarea numărului maxim de 8 doctoranzi/conducător de doctorat. Pentru locurile disponibile au prioritate membrii Academiei Române, cercetătorii științifici CSI, cercetătorii științifici CSII, având în vedere totodată vechimea în activitatea doctorală, numărul studenților doctoranzi îndrumați care au obținut titlul de doctor.

Pentru a putea fi aplicabilă redistribuirea descrisă mai sus, fiecare şcoală doctorală va înainta spre completare conducătorilor de doctorate, înainte de fiecare sesiune de admitere, un document-declaraţie privind statutul de conducător de doctorat (*Formular de declarare a statutului conducătorului de doctorat, ANEXA la Regulamentul Școlii Doctorale de ..... din cadrul SCOSAAR*), care trebuie să conţină: 1. calitatea de membru al Academiei Române (nu este membru, este membru corespondent sau membru titluar); 2. funcţia şi statutul exact de conducător (gradul de cercetare şi dacă este doar abilitat sau conduce efectiv doctorate – are întâietate calitatea de conducător efectiv); 3. numărul de ani de experienţă (în calitate de abilitat/conducător de doctorate – are prioritate calitatea de conducător efectiv), numărul de doctoranzi coordonaţi care au obţinut deja titlul de doctor.

În ceea ce priveşte cazul în care o şcoală optează pentru 2 sesiuni de admitere, procedura redistribuirii locurilor se aplică numai în interiorul şcolilor şi între şcolile care participă la sesiunea respectivă (de exemplu, dacă o şcoala optează doar pentru sesiunea din septembrie, locurile aprobate vor fi securizate până la demararea procesului de admitere în sesiunea din septembrie). Dacă o şcoală optează doar pentru prima sesiune, şi, în urma examenului de admitere, rămâm locuri libere, acestea se pot securiza în dreptul şcolii până înaintea începerii celei de-a doua sesiuni, când şcoala va decide dacă mai organizează sau nu o a doua sesiune. Dacă decide că nu o va face, va înştiinţa SCOSAAR în timp util prin procedura de mai sus în vederea cedării locurilor rămase libere către alte şcoli pentru sesiunea din septembrie.

O persoană poate beneficia de finanţare de la buget pentru un singur program de doctorat.

Orice alte detalii în legătură cu admiterea la studiile universitare de doctorat pot fi obţinute de la institutele din cadrul Academiei Române, în funcție de domeniul vizat, la care candidaţii doresc să susţină concursul.

SCOSAAR, prin Şcolile doctorale de la nivelul institutelor de cercetare, va lua măsuri pentru aducerea la cunoştinţa candidaţilor, prin afişare în termen legal, a tematicilor şi bibliografiilor pentru programele la care se organizează concurs de admitere.

V. Desfăşurarea concursului

Accesul candidaţilor în sala de concurs se face pe baza actului de identitate şi se consemnează în lista nominală prezenţa acestora. Este interzisă intrarea în sala de concurs cu telefoane mobile, calculatoare, agende electronice sau alte materiale.

Concursul de admitere la studiile universitare de doctorat se desfăşoară în cadrul institutelor de cercetare ale Academiei Române, în prezenţa comisiei de examinare. Conducătorul de doctorat face parte din comisia de admitere.

Admiterea propriu-zisă la studiile universitare de doctorat este procesul de selecţie a candidaţilor pentru fiecare poziţie vacantă de student-doctorand, aprobată de Prezidiul Academiei Române pentru respectivul conducător de doctorat.

Concursul are loc în limita locurilor libere ale fiecărui conducător de doctorat.

Concursul de admitere la doctorat este valabil numai pentru domeniul de doctorat pentru care s-a înscris candidatul. Concursul se organizează pe fiecare domeniu şi conducător de doctorat, pentru locurile finanţate cu bursă sau finanțate fără bursă, şi, după caz, pentru cele cu taxă, statutul candidaţilor admişi stabilindu-se în funcţie de opţiunea exprimată la data înscrierii şi de media la admitere.

Selecţia candidaţilor la doctorat pentru o poziţie vacantă este realizată de comisia de admitere, în limita locurilor vacante aprobate.

În urma probei de concurs, candidaţii sunt apreciaţi în raport cu nivelul de pregătire şi informare în domeniu, cu capacitatea de a evidenţia orientările majore ale cercetării în direcţia de cercetare propusă şi cu capacitatea de a formula soluţii şi căi de rezolvare (teoretică şi experimentală) a problemelor identificate.

Evaluarea candidaţilor la concurs se va realiza în raport cu următoarele criterii (Anexa 4):

1 - Nota obținută la proba orală, evaluată în raport cu:

- Definirea obiectivelor cercetării ştiinţifice (10% din evaluare);
- Metodologia cercetării (10% din evaluare);
- Rezultatele ştiinţifice ale candidatului în domeniul ales (articole, studii menţionate în CV sau alte activități științifice relevante) (20% din evaluare);
- Gandire logică: candidatul evocă date, fenomene, evenimente, răspunde organizat la subiecte complexe, dă răspunsuri logice, coerente, la subiect (10% din evaluare);
- Exprimarea clară și precisă a ideilor: răspunde exact la întrebările ce i-au fost adresate, accentuează ideile principale, formulează fraze complexe, dar comprehensibile, nu se pierde în cuvinte, termină ideea începută, ideile prezentate au o continuitate, decurgând logic (10% din evaluare);
- Nivelul de pregătire şi informare în domeniul de doctorat ales (bibliografie, tematică) (40% din evaluare).

2- Nota obținută la prezentarea proiectului tematic de cercetare va fi evaluată în raport cu:

- Contextul ştiinţific şi motivaţia temei alese (40% din evaluare);
- Rezultatele estimate (40% din evaluare);
- Calitatea prezentării proiectului (20% din evaluare).

VI. Rezultatele concursului

Media minimă de admitere la studiile universitare de doctorat este de 8 (opt), indiferent dacă locul este cu bursă, fără bursă sau cu taxă.

La fiecare probă de concurs, candidații trebuie să obțină cel puțin media 7 (șapte). Media se calculează cu două zecimale, fără rotunjire.

La medii de admitere cu punctaje egale, departajarea se va realiza în funcţie de media aritmetică dintre media de absolvire a studiilor universitare de licenţă şi media de absolvire a studiilor universitare de masterat. Prin excepţie, în cazul candidaţilor care au dreptul legal de a se înscrie la concursul de admitere la studiile universitare de doctorat fără a fi urmat studii universitare de masterat, pentru departajare se va lua în considerare media de absolvire a studiilor universitare de licenţă.

Calificativul admis/respins se stabilește în urma unui vot direct și secret al membrilor comisiei de evaluare. Rezultatele votului se regăsesc în procesul verbal atașat fiecărui dosar de candidatură evaluat/persoană.

Școala doctorală gestionează eventualele contestaţii înregistrate, în conformitate cu prevederile regulamentului propriu, şi afișează rezultatele derulării acestei proceduri.

(1) Eventualele contestaţii cu privire la rezultatele concursului de admitere se depun la institutul unde are loc concursul de admitere, în conformitate cu regulamentele de admitere specifice școlii doctorale.

(2) Nu se admit contestaţii pentru probele orale.

(3) Nu se admit contestaţii care au la bază necunoaşterea regulamentului propriu de admitere.

(4) După expirarea termenului de rezolvare şi de răspuns (prin afişare) la contestaţii, rezultatul concursului de admitere este definitiv şi nu mai poate fi modificat.

(5) Rezolvarea contestaţiilor este în exclusivitate de competenţa comisiei de contestaţii din cadrul institutului/școlii doctorale unde a avut loc concursul de admitere. Decizia comisiei de contestaţii este definitivă.

Rezultatele finale vor fi transmise către SCOSAAR pe adresa de email scosaar@acad.ro .

Candidaţii care îşi retrag actele de înscriere înainte de afişarea rezultatului final al concursului sunt consideraţi eliminaţi din concurs.

Rezultatele concursului de admitere vor fi validate de către Consiliul şcolii doctorale (CSD) şi Consiliul pentru studii universitare de doctorat (CSUD) și aprobate de către Prezidiul Academiei Române și se aduc la cunoştinţă prin afişare în termen de cel mult 48 de ore de la data finalizării acestuia.

Candidaţii declaraţi admişi sunt înmatriculaţi la studiile universitare de doctorat în baza rezultatului concursului prin decizia preşedintelui Academiei Române.

Dosarele candidaţilor respinşi sau ale celor care renunţă la şcolarizare se restituie candidaților, la cerere, în cel mult 48 de ore de la depunerea cererii, obligatoriu gratuit, pe baza actelor de identitate, după afișarea rezultatelor finale.

VII. Înmatricularea candidaţilor declaraţi admişi

După aprobarea rezultatelor admiterii de către Prezidiul Academiei Române se va realiza înmatricularea candidaţilor declaraţi admişi.

Înmatricularea candidaţilor declaraţi admişi în urma concursului de admitere se face prin decizia preşedintelui Academiei Române. După înmatriculare, studenţii doctoranzi sunt înscrişi în Registrul

matricol unic (RMU) cu un număr unic valabil pentru întreaga perioadă de şcolarizare la specializarea/ programul de studii la care au fost admişi.

Candidaţii declaraţi admişi semnează contractul de şcolarizare. Aceştia vor întocmi, împreună cu conducătorul de doctorat, planul studiilor universitare de doctorat, semnat olograf. De asemenea, conducătorul de doctorat propune/nominalizează componenţa comisiei de îndrumare și integritate academică, conform Regulamentului Şcolii Doctorale din cadrul IOSUD Şcoala de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR).

Comisia de îndrumare și integritate academică este compusă din **trei membri**, cercetători cu experiență care dețin titlul de doctor, din care cel puțin unul provine de la o altă instituție. Componența comisiei de îndrumare și intergitate academică se stabilește în termen de cel mult 30 zile de la data înmatriculării și se aprobă prin decizie semnată de către directorul SD.

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE

ŞCOALA DOCTORALĂ DE.....

Aprobat,

Director Şcoală doctorală.....

CERERE DE INSCRIERE

pentru colocviul de admitere la doctorat

- Sesiunea:
- Domeniul de doctorat:
- Forma pregătirii: cu frecvență „cu bursă /fără bursă”, cu frecvenţă redusă cu taxă*
- Conducător științific:_____

CANDIDAT:

Numele și prenumele cu inițiala tatălui…….....

Prenumele părinților: tatăl……....., mama…….....

Domiciliu stabil:

Localitatea…….....Strada.…….....

.....Nr.....Scara.....Bloc.....Apartament.....Sector…...….....Cod poștal..... E-mail.....Tel...……...

Domiciliu…….....Fax.....Tel. mobil.....

Naționalitatea……...Data nașterii…….....

Localitatea……..Județul……...

Profesia de bază……..... Locul de muncă……..

Adresa instituției unde lucrează…….....

Telefon…… E-mail.....

Studii superioare absolvite (inclusiv anul absolvirii și durata studiilor):

1……

..……

2……

.....

3.....

.....

Domeniul în care candidatul a obținut licența:

1.....

2.....

3.....

Cursuri de master absolvite (inclusiv anul absolvirii și durata studiilor):

1.....

2.....

Domeniul în care candidatul a obținut specializarea (master):

1.....

2.....

Limbi străine cunoscute (scris, citit, vorbit)…….....

…….

Menționez că am susținut testul la limba de circulație internațională .....…….. .....și am obținut, conform cadrului de referință elaborat de Consiliul Europei, nivelul.....

Starea civilă …….....

Etnie.....

Stare socială specială .....

Situație medicală specială.....

Vă rog să aprobați înscrierea pentru participarea la colocviul de admitere la doctorat sesiunea ....., forma cu frecvență și „cu bursă/fără bursă”, frecvenţă redusă cu taxă.

Data……

Semnătura……

*se va alege o singură variantă (cu bursă, fără bursă sau cu taxă)

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ŞCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE

SCOALA DOCTORALĂ DE .....

FIŞA DE ÎNSCRIERE

1. *Institutul* _____
2. *Domeniul*_____
3. *Forma de pregătire cu frecvenţă,* „cu bursă/fără bursă ”, *cu frecvenţă redusă* cu taxă*****

_____

	Secţiunea 1.1 **Date personale ale candidatului[1] cu cetăţenie română/străină**				
1	Numele de familie la naştere (din certificatul de naştere)				
2	Numele de familie actual (după căsătorie, înfiere etc.)				
3	Prenumele				
4	Iniţialele tatălui/mamei[2]				
5	CNP[3]				
6	Data naşterii	Anul	Luna		Ziua
7	Locul naşterii	Ţara de origine		Judeţul/ Tara[4]	Localitatea
8	Sexul	F ☐ M ☐			
9	Starea civilă[5]	Căsătorit(ă) ☐	Necăsătorit(ă) ☐	Divorţat(ă) ☐ Văduv(ă) ☐	
10	Starea socială[6] specială	Orfan de un părinte ☐ sau de ambii părinţi ☐			
		Provenit din case de copii ☐	Provenit din familie monoparentală ☐		

11	Cetățenia	Română, cu domiciliul în România/ în străinătate	
		Alte cetățenii	
		Cetățenie anterioară, dacă este cazul	
12	Etnia[7]		
13	Domiciliul stabil	Țara:	Județul[8]/ (Țara[9]):
		Localitatea:	
		Adresă (stradă, număr, bloc, scară, etaj, apartament, sector)[10]	
14	Actul de identitate / Documentul de călătorie[11]	Seria:	Numărul:
		Eliberat de:	Data eliberării:
		Perioada de valabilitate	
15	Alte date personale ale candidatului	Telefon,	Adresă de e-mail
16	Candidat care se încadrează în categoria persoanelor cu dizabilități	Se bifează numai de persoanele aflate în această situație, pe bază de documente	
	Secțiunea I.3.a - Date privind pregătirea anterioară a candidatului[12] (absolvent de liceu)		
1	Studiile preuniversitare absolvite, nivel liceu	Instituția unde a absolvit	
		Țara:	Localitatea:
		Județul:	Filiera Profilul Specializarea
		Durata studiilor:	Anul absolvirii:
		Forma de învățământ (Zi / Seral / FR / ID)	
2	Datele de identificare ale diplomei	Tipul (diploma de bacalaureat sau echivalentă)	
		Seria	
		Numărul	
		Emisă de	
		Anul emiterii	
		Numărul foii matricole care însoțește actul de studii	
3	Alte observații (pentru	Vizarea / Recunoașterea diplomei	

	cazurile în care candidatul a absolvit studii anterioare în străinătate)	prezentate (DGRIE - acorduri bilaterale / DGISERSD-MECTS)		
		Nr. / Serie act de recunoaștere / echivalare (eliberat de DGRIE / DERD)[13]		
	Secțiunea I.3.b.1 - Date privind pregătirea anterioară a candidatului[14] (absolvent de ciclu de învățământ universitar)			
1	Studiile universitare absolvite	Țara:	Localitatea:	
		Județul:		
		Denumirea instituției:		
		Facultatea:		
		Domeniul/ Profilul:		
		Programul de studii/ Specializarea:		
		Titlul obținut:	Forma de învățământ (zi/FR/ID/seral)	
		Forma de finantare a studiilor (buget/ taxă): Nr. de semestre finanțate de la buget:		
		Durata studiilor (ani):	Anul absolvirii:	
2	Datele de identificare ale actului de studii	Tipul – denumirea (diplomă/diplomă de licență/echivalentă)		
		Seria		
		Numărul		
		Emis de:		
		Anul emiterii:		
		Numărul suplimentului la diplomă/foii matricole care însoțește actul de studii		
3	Alte observații (pentru cazurile în care candidatul a absolvit studii în străinătate)	Vizarea/Recunoașterea diplomei prezentate (DGRIE - acorduri bilaterale/ DGISERSD-MECTS)		
		Nr./Serie act de recunoaștere/echivalare (eliberat de DGRIE / DERD)[15]		
	Secțiunea I.3.b.2 - Date privind pregătirea anterioară a candidatului[14] (absolvent de ciclu de învățământ universitar)			
1	Studiile universitare absolvite	Țara:	Localitatea:	
		Județul:		
		Denumirea instituției:		
		Facultatea:		
		Domeniul/ Profilul:		

		Programul de studii/ Specializarea:	
		Titlul obținut:	Forma de învățământ (zi/FR/ID/seral)
		Forma de finantare a studiilor (buget/taxă): Nr. de semestre finanțate de la buget:	
		Durata studiilor (ani):	Anul absolvirii:
2	Datele de identificare ale actului de studii	Tipul – denumirea (diplomă/diplomă de master/echivalentă)	
		Seria	
		Numărul	
		Emis de:	
		Anul emiterii:	
		Numărul suplimentului la diplomă/foii matricole care însoțește actul de studii	
3	Alte observații (pentru cazurile în care candidatul a absolvit studii în străinătate)	Vizarea/Recunoașterea diplomei prezentate (DGRIE - acorduri bilaterale/ DGISERSD-MECTS)	
		Nr./Serie act de recunoaștere/echivalare (eliberat de DGRIE / DERD)[15]	

[1] La înscriere sau la modificarea datelor personale (după caz)

[2] Acolo unde este cazul (de exemplu: familie monoparentală)

[3] Sau alt cod de identificare personală, pentru candidații străini

[4] Numai pentru candidații străini

[5] Poate să nu fie declarată

[6] Se aplică doar candidaților cu o situație socială specială

[7] Numai pentru candidații români (poate să nu fie declarată)

[8] Numai pentru candidații români

[9] Numai pentru candidații străini

[10] Se solicită și pentru studenții străini

[11] Documentul de călătorie numai pentru candidații străini (act de identitate pentru cetățenii UE/ SEE sau pașaport pentru stduenții străini cu altă cetățenie decât UE/ SSE)

[12] Pentru candidatul străin care vrea să studieze în România se va considera numai documentul care atestă recunoașterea/ echivalarea studiilor anterioare (document eliberat de DERD), care permit înscrierea în învățământul superior

[13]Aplicabil pentru candidații români care au finalizat studiile anterioare în străinătate sau pentru candidații străini

[14] Se aplică și pentru candidații străini

[15] Idem 13

Prin transmiterea voluntară de către dumneavoastră a oricăror date personale sau informații, vă exprimați consimțământul pentru ca aceste date să fie colectate, înregistrate, stocate, prelucrate în bazele de date ale Academiei Române, precum și transferate către instituțiile față de care Academia Română are obligații legale.

Academia Română respectă toate obligațiile legale care îi revin în legătură cu prelucrarea de date personale.

Data: **Semnătura candidatului,**

*se va alege o singură variantă (cu bursă, fără bursă sau cu taxă)

Anexa 3

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE …….

PROPUNERE TEMĂ/TITLU TEZĂ DE DOCTORAT

Numele și prenumele candidatului:
.....

Domeniul în care candidează: .....

Conducătorul științific:
.....

Tema/titlul propuse:.....
.....
.....

Importanța temei (Scurtă prezentare):

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ŞCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
ŞCOALA DOCTORALĂ DE .....

Institutul..... Notă INTERVIU: .....
Nr. inreg

Sesiunea: .....
Nume, Inițiala tatălui, Prenumele: .....
CNP: .....
Semnătura candidatului: .....

Fișa evaluare INTERVIU

Profilul interviului	**Puncte maxime**	**Puncte obținute**
Partea I: Proba orală	***100p***	
• Definirea obiectelor cercetării științifice	10p	
• Metodologia cercetării	10p	
• Rezultatele științifice ale candidatului în domeniul ales	20p	
• Gândire logică	10p	
• Exprimare clară și precisă a ideilor	10p	
• Nivelul de pregătire și informare în domeniul de doctorat ales	40p	
Partea II: Prezentare proiectului tematic de cercetare	***100p***	
• Contextul științific și motivația temei alese	40p	
• Rezultatele estimate	40p	
• Calitatea prezentării proiectului	20p	
Total		

PREȘEDINTE,

MEMBRII COMISIEI,
1._____
2._____
3._____

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE .....

PROCES VERBAL

Încheiat astăzi ....., în urma desfășurării concursului de admitere la doctorat la forma *cu frecvență* „cu bursă/fără bursă", *cu frecvență redusă* cu taxă*****, în domeniul de doctorat „.....", conducător științific .....
În baza aprobării Prezidiului Academiei Române din data de ....., referitoare la organizarea și desfășurarea admiterii la doctorat în anul universitar ....., comisia a examinat dosarele candidaților care și-au prezentat activitatea și temele pe care doresc să le dezvolte în cadrul tezelor de doctorat și a evaluat rezultatele probelor concursului:

Președinte:.....

Membri:.....

.....
.....

Numele și prenumele candidatului	Cod de atribuire	Nota obținută la examenul de ……. *	Nota obținută la proba orală	Nota obținută la prezentarea proiectului tematic de cercetare	Media obținută la colocviul de admitere la doctorat**

Ca urmare a aprecierii activității candidaților și a evaluării probelor de concurs, comisia a declarat:

ADMIȘI DOCTORANZI
BURSIERI:_____
_____

ADMIȘI DOCTORANZI FĂRĂ BURSĂ: _____
_____

RESPINȘI:_____

PREȘEDINTE, **MEMBRII COMISIEI,**

1._____
2._____
3._____

_____

**pentru absolvenții cu diplomă de licență în alt domeniu decât cel ……..sau pentru cei care au absolvit în domeniul ……., dar notele obținute la disciplinele din domeniul de doctorat, rezultate din foia matricolă, sunt sub 8,00 (opt).*
***pentru declararea candidaților admiși/respinși comisia va ține cont numai de media obținută la colocviul de admitere la doctorat, cu condiția ca media la examenul de ……. să fie de cel puțin 8,00 (opt), iar calificativul la examenul de competență lingvistică la care nivelul minim să fie B2, conform cadrului de referință al Consiliului Europei (sunt condiții eliminatorii).*
Media minimă de admitere la doctorat este 8,00 (opt). Media se calculează cu două zecimale fără rotunjire.

Anexa 6

A C A D E M I A R O M Â N Ă
ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE .....

Institutul.....
Nr. inreg.

REZULTATELE COLOCVIULUI DE ADMITERE

– Sesiunea ..... 2026 –

ID Candidat	Nume și prenume candidat	Conducător de doctorat	Nota finală la probele susținute	Admis*	
				Cu frecvență cu bursă	Cu frecvență redusă fără bursă fără taxă/cu taxă

Întocmit,
Nume și prenume,

Semnătura,

*** Exemplu:**

Admis	
Cu bursă	Fără bursă
DA	-
-	DA (cu taxă/fără taxă)

ANEXA

la Regulamentul Școlii Doctorale de ..... din cadrul SCOSAAR

Formular de declarare a statutului conducătorului de doctorat

Declarație privind statutul profesional și experiența conducătorului de doctorat:

Subsemnatul/Subsemnata, **Nume și prenume:**_____

Instituția: _____

Domeniul: _____

Funcția: _____

în calitate de conducător de doctorat în cadrul Școlii Doctorale de ....., declar următoarele (se bifează cu x calitatea corespunzătoare:

1. Calitatea de membru al Academiei Române

- ☐ Membru titular al Academiei Române
- ☐ Membru corespondent al Academiei Române
- ☐ Nu sunt membru al Academiei Române

2. Statutul profesional (gradul științific)

- ☐ CS I (Cercetător Științific I), abilitat
- ☐ CS II (Cercetător Științific II), abilitat
- ☐ CS III (Cercetător Științific III), abilitat

3. Experiența în calitate de conducător de doctorat

Declar că am o vechime de: **___/___ ani** în calitate de abilitat/conducător de doctorate.

4. Doctoranzi coordonați care au obținut titlul de doctor

Până la data prezentei declarații, **_____ doctoranzi** coordonați de mine au obținut titlul de doctor.

Declarație pe propria răspundere

Declar că informațiile furnizate sunt reale, complete și pot fi verificate în evidențele instituționale.

Data: ____ / ____ / _____ **Semnătura conducătorului de doctorat:**
_____

Institute of Cellular Biology and Pathology

"Nicolae Simionescu"

B. P Hașdeu Street, No.8, Sector 5, Bucharest, Romania

Phone:021.319.45.18; www.icbp.ro

REGULATION

on the organization of the promotion exam for obtaining the professional degrees CSIII, CSII and CSI within the "Nicolae Simionescu" Institute of Cellular Biology and Pathology of the Romanian Academy

Approved,

Section of Biological Sciences of the Romanian Academy

Chapter I. General Provisions

Article 1.

The scientific career development of the research and development staff employed at the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" (ICBP-NS) of the Romanian Academy is ensured and carried out through promotion to the next higher professional grades.

Article 2.

Promotion is carried out through an examination organized in accordance with the provisions of Law 53/2003 on the Labor Code, Law 183/2024 on the Status of Research, Development and Innovation (RDI) personnel, Order of the Ministry of National Education and Scientific Research no. 6129/20.12.2016, the Methodological Norms on the organization of the promotion examination for obtaining higher professional research grades issued by the Romanian Academy on July 15th, 2025, and in accordance with this regulation.

Article 3.

This Regulation includes the methodology regarding the organization of the promotion examination for obtaining higher professional research grades: CSIII, CSII, and CSI at ICBP-NS.

Article 4.
Promotion to professional grades of already employed RDI personnel is carried out by transforming the occupied position into an immediately higher position, corresponding to the professional grade obtained through the examination.

Article 5.
Scientific researchers at ICBP-NS are differentiated by functions and professional research and development grades, maintaining equivalence with the professional grades provided in the European Charter for Researchers, as follows:

(i) Scientific Researcher Grade I (CSI), equivalent to Principal Senior Researcher R4, holding a PhD;
(ii) Scientific Researcher Grade II (CSII), equivalent to Established Senior Researcher R3, holding a PhD;
(iii) Scientific Researcher Grade III (CSIII), equivalent to Recognized Researcher R2, holding a PhD;
(iv) Scientific Researcher (CS), equivalent to Junior Researcher R1, holding a PhD or being a PhD student;
(v) Assistant Scientific Researcher (ACS), equivalent to Assistant in Scientific Research, holding a Bachelor's degree.

Article 6.
The number of RDI positions financed by the annual State Budget Law is established annually by the Romanian Academy, which will allocate the budget line accordingly and with the approvals of the Ministry of Public Finance.

Article 7.
The promotion examination is organized at the decision of the ICBP-NS management, depending on available financial resources and human resources policy, within the approved budgets and in compliance with legal provisions.

Article 8.
Employment in RDI positions is carried out through competition/examination, which is organized based on the following principles:

a. the principle of transparency, competence, gender equality, non-discrimination, and equal and fair access to filling vacant positions and promotion to a higher professional grade;
b. the principle of ensuring the quality and professional training of research staff;
c. correct and complete information regarding the organization and conduct of competitions/promotion examinations;
d. transparency regarding administrative, financial, and evaluation information of research positions in accordance with current legislation.

Chapter II. Minimum Training Conditions

Article 9.
The promotion examination is organized at the decision of the ICBP-NS management, following the request of the person who meets the provisions of Law no. 183/2024 regarding the necessary

conditions for registration, paragraphs (10) and (11), and the minimum standards specific to each scientific field, paragraph (1); as well as the additional standards established within the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" of the Romanian Academy (Annex SC).

Article 10.
The criteria on which the minimum standards for occupying the functions and professional grades of the RDI staff from ICBP-NS are based are as follows:
a. results of research and/or innovation activity;
b. impact of research and/or innovation activity;
c. ability to attract research funds or to collaborate with public and/or private research organizations;
d. professional prestige;
e. organizational capacity;
f. capacity for international cooperation.

Article 11.
The minimum standards for the professional research-development grades established by the Romanian Academy are:
(1) For the professional grades CSII and CSI, the minimum standards are approved by order of the Minister of Education;
(2) For the professional grade CSIII, the minimum standards are:
a. to hold a doctoral degree in the specialty or in related fields;
b. at least five articles published in journals indexed in the Web of Science – Core Collection;
c. at least one paper presented at an international conference.

Article 12.
The additional necessary and mandatory minimum standards established by ICBP-NS for the evaluation of candidates' professional activity are presented in Annex SC of the Procedure regarding the recruitment, selection, and promotion of RDI staff. These are established and approved by the Scientific Council of ICBP-NS and do not derogate from the minimum standards provided by law.

Article 13.
Scientific researchers CS, CSIII, and CSII, who exceed by at least 50% at least two-thirds of the institute's own minimum standards, provided in Article 12, may take the examination for promotion to the next professional grade within ICBP-NS of the Romanian Academy, with which they have an indefinite-term individual employment contract, and may be promoted by signing an additional act to the existing individual employment contract. All the minimum standards included in the annex provided for in Article 12 must be met, and two-thirds of the institute's own minimum standards, whichever they may be, must be exceeded by at least 50%.

Chapter III. Conduct of the Examination

Article 14.
The calendar for conducting examinations at ICBP-NS, for filling vacant positions, is as follows:
a. the application for registration to the examination is drawn up and submitted for approval to the Scientific Council of ICBP-NS (Annex 1P);
b. registration for the examination and submission of the examination file is carried out within a

maximum of 30 calendar days, according to the schedule in the announcement for the promotion examination, published on the institute's website;
c. decisions are drawn up with the composition of the examination/appeals commissions and the designation of the commission president;
d. the examination files are submitted to the president of the examination commission, after being previously registered and verified by the secretary of the examination commission, for analysis;
e. the entire examination procedure must be completed within 15 days from the closing date of registration, at the level of the examination commission, and within 45 days from the submission of the commission's report and file to the Presidium of the Romanian Academy;
f. within a maximum of 2 days from the communication of the result, candidates have the right to file an appeal;
g. within a maximum of 2 working days from the completion of the examination, the final result of the examination is communicated.

Article 15.
Members of the examination commission are scientific researchers or university teaching staff with a professional grade or university teaching title at least equal to the professional grade for which the examination is organized. The work of the examination commission is led by one of its members, as president, appointed by decision of the Director of ICBP-NS. The composition of the commission is:
a. 3 members, in the case of the examination for CS and CSIII;
b. 5 members, of which at least 3 are from outside ICBP-NS, for CSII and CSI.

Article 16.
The promotion examination for obtaining the professional grades of CSIII, CSII, and CSI consists of:
c. analysis of the application file for the examination, which must contain the documents provided in Annex DP (only the standard forms approved by ICBP-NS according to this Regulation will be used: Annexes 1P–5P, drawn up according to the models proposed in the Methodological Norms on organizing the promotion examination for obtaining professional grades of RDI staff in institutes of the Romanian Academy / July 15, 2025);
d. verification of compliance with the conditions provided in Articles 11 and 12;
e. awarding of scores based on evaluation according to the annex provided in Article 12.

Article 17.
The results of the evaluation process are recorded by each member of the examination commission in an assessment report (Annex 2E), on the basis of which the president of the examination commission prepares a report on the examination, signed by each member, and proposes the granting of the professional research-development grade to the respective candidate.

Article 18.
The Scientific Council analyzes compliance with the procedures established by the regulation and approves or rejects the examination report, by open nominal vote.

Article 19.
Candidates dissatisfied with the examination result may submit appeals, which will be resolved within 2 working days from their registration, by the appeals resolution commission, composed of:
a. president and 2 members, scientific researchers or university teaching staff, in the case of

commissions for resolving appeals submitted following examinations for filling research execution positions;
b. 3 members, namely one member from the specialized section of the Romanian Academy, Section of Biological Sciences , who is also the President of the commission, and 2 members from ICBP-NS holding CSI grade, in the case of commissions for resolving appeals submitted following examinations for filling research management positions.
c. the secretary of the appeals resolution commission will be appointed from within ICBP-NS by decision of the Director of ICBP-NS.

Article 20.
The examination commission and the appeals resolution commission benefit from administrative support from the research organization, provided by a secretary appointed by administrative act of the head of the research organization, who is not a member of the commission and does not take part in the commission's decisions. The standard forms used by the members of the commissions will be those proposed and approved in accordance with this Regulation (Annexes 1E and 2E, drawn up according to the models proposed in the Methodological Norms on organizing the promotion examination for obtaining professional grades of RDI staff in institutes of the Romanian Academy / July 15, 2025).

Article 21.
The promotion examination files for obtaining the professional grades of CSIII, CSII, and CSI are submitted by ICBP-NS within 10 calendar days from the completion of the examination to the Section of Biological Sciences of the Romanian Academy.

Chapter IV. Results of the Examination and Appointment to the position

Article 22.
Following the approval of the favorable examination result conducted at ICBP-NS by the Presidium of the Romanian Academy, the President of the Romanian Academy issues the decision for employment and granting of the professional research-development grade of CSIII, CSII, or CSI to the promoted candidate, in accordance with the provisions of Article 10 of Law no. 183/2024.

Article 23.
After the approval of the results of the promotion examination by the Presidium of the Romanian Academy, the file is returned to ICBP-NS.

Article 24.
Under the conditions of Article 4, if the researcher passes the examination, they will be employed in the position corresponding to the professional grade obtained through the examination, by signing an additional act to the existing individual employment contract. The position corresponding to the higher research grade resulting from the transformation of the position previously held by the person before promotion will be budgeted no later than the year following the one in which the promotion took place, and the additional act to the individual employment contract will be concluded starting no later than January 1 of the year following the one in which the promotion examination was passed, based on the decision issued by the Romanian Academy.

Article 25.
Employment in positions corresponding to the functions and professional grades of RDI staff is carried out according to the principle of professional merit, based on transparent and fair procedures that respect the general principles and conditions provided by the European Charter for Researchers.

Article 26.
The equivalence of university teaching functions with the functions and professional RDI grades within ICBP-NS applies only with the approval of the Scientific Council, after the evaluation of the additional standards adopted at ICBP-NS.

Article 27.
The personal data of individuals involved in the examination process are processed within the information platform, in compliance with the provisions of Regulation (EU) 2016/679 on the protection of natural persons with regard to the processing of personal data and on the free movement of such data, and repealing Directive 95/46/EC (General Data Protection Regulation).

Article 28.
A summary report on the organization and conduct of the promotion examination is prepared at the level of ICBP-NS by the human resources officer and submitted annually, within 15 calendar days from the end of the calendar year for which the reporting is made, both in physical format with a forwarding address, to the Research and Doctoral Programs Service, and in electronic format to the email address bpg@acad.ro.

Article 29.
Annexes DP, L, 1P–5P, 1E, and 2E form part of this Regulation and, together with it, were established and drawn up by ICBP-NS in accordance with the regulations and models proposed by the Romanian Academy in the Methodological Norms on organizing the promotion examination for obtaining professional grades of RDI staff in institutes of the Romanian Academy / July 15, 2025.

The present Regulation was approved in the meeting of the Scientific Council of ICBP-NS on August 7, 2025. It may be adjusted based on the calibration provided by the examinations for each category (scientific degree) that will take place subsequently.

Director,

Acad. Maya Simionescu

Annex SC

Minimum Standards of the "Nicolae Simionescu" Institute of Cellular Biology and Pathology for the Award of Professional Grades

The filling of research, development, and innovation (RDI) positions within the "Nicolae Simionescu" Institute of Cellular Biology and Pathology (ICBP-NS) is carried out either through a competition organized for a vacant position, or through an examination for promotion to a higher professional grade than the one currently held.

In order to participate in the competitions organized by ICBP-NS for filling vacant RDI positions, candidates must mandatorily meet the legal minimum standards (according to Law 183/2024 and the Minister's Order no. 6129/2016 on the status of RDI personnel), as well as the additional internal standards established and approved by the Scientific Council of ICBP-NS.

For promotion, only scientific researchers (CS, CSIII, and CSII) with permanent employment contracts who exceed by at least 50% at least two-thirds of ICBP-NS's own minimum standards may take the examination for promotion to a higher professional grade within ICBP-NS. Promotion is carried out through the conclusion of an addendum to the existing employment contract.

1. Minimum ICBP-NS Standards for Awarding the Professional Grade of CSI

Scientific Researchers **CSII**, who have permanent employment contracts, may take the exam for promotion to a higher professional grade within ICBP-NS, provided that they meet the following criteria:

- fulfill all 4 minimum standards under Criteria 1–4;
- exceed by at least 50% at least three of these four minimum standards.

Promotion is carried out through an addendum to the existing employment contract.

Criterion 1. Scientific articles published after the PhD, as main author

Minimum standard: The candidate must have published, after obtaining the PhD title, at least **4 articles** in ISI-indexed journals, with a cumulative AIS* of at least 4, where the candidate appears as main author (first author, corresponding author, or last author, as applicable).

For promotion (≥50% above standard): At least 6 ISI-indexed articles, with a cumulative AIS* ≥ 6, where the candidate is main author.

Criterion 2. Scientific articles published in the last 5 years, as main author

Minimum standard: The candidate must have published, in the last 5 years, at least 2 articles in ISI-indexed journals – each article with an AIS* of at least 0.5 – in which the candidate appears as main author (first author, corresponding author, or last author, as applicable).

For promotion (exceeding the standard by at least 50%): The candidate must have published, in the last 5 years, at least 3 articles in ISI-indexed journals – each article with an AIS* of at least

0.5 – in which the candidate appears as main author (first author, corresponding author, or last author, as applicable).

***Note:*

-AIS (Article Influence Score), according to https://jcr.clarivate.com/ for the year of publication; for articles published before 2007, the AIS value from 2007 will be used. If the classification for the year of publication is not available, the most recent available classification will be considered.

-The AIS value for mandatory preliminary conditions is divided according to the formula: AIS/pi**,** where *pi* = 1 when the article has 1, 2, or 3 main authors (defined as first, last, and corresponding), or equals the number of main authors when there are more than 3.

-At least 50% of published scientific articles must be listed in Web of Science under the category *"document type: article"*. This percentage does not include works classified as *"review"* or multiple combinations such as *"Article; Proceedings Paper"*, *"Article; Book Chapter"*, etc

Criterion 3. Coordination of research projects/grants obtained after the PhD

Minimum standard: The candidate must have coordinated, after obtaining the PhD degree, at least two research projects/grants, national or international, in one of the following variants:

• two projects (national or international), as Project Director or Partner Coordinator, or

• one national project and one international project (as Director or National Coordinator).

Note: For at least one of these projects, the coordinated research team must include a minimum of 3 members**.**

For promotion (exceeding the standard by at least 50%): The candidate must have coordinated, after obtaining the PhD degree, at least three research****** projects/grants, national or international, in one of the following variants:
• 3 research projects/grants (national or international), as Project Director or Partner Coordinator, or
• 2 national projects and 1 international project (as Director or National Coordinator), or
• 1 national project and 2 international projects (as Director or National Coordinator).

Note: For at least one of these projects, the coordinated research team must include a minimum of 3 members**.**

******Note:

-Projects must be obtained either: (1)through national or international competition (in which case a link to the competition page or other documents proving the competition must be provided), or through non-competitive allocation, provided the project budget is at least **€50,000**.

-Projects that do not include logistics expenses, grants funded by the candidate's own institution, or grants for congress participation will not be considered.

-Projects must be carried out in an institution with research and development activities.

Criterion 4. Quantification of Scientific Activity

Minimum standard: Total score obtained based on the calculation of indicators from Table 1: **500 points Σ1–2** and **600 points Σ1–18**.

For promotion (exceeding the standard by at least 50%): Total score obtained based on the calculation of indicators from Table 1: **750 points Σ1–2** and **900 points Σ1–18**.

Table 1 – Parameters Considered and their Quantification

No.	Parameter	Calculation Method	*Score*
1.	Articles in WoS-indexed journals, as main author	according to the formula (1)	
2.	Articles in WoS-indexed journals, as co-author	according to the formula (2)	
3.	Articles in BDI-indexed journals, as main author	(1+C_1)+(1+C_2)+... (1+C_n)	
4.	Articles in BDI-indexed journals, as co-author	0.7 x [(1+C_1)+(1+C_2)+... (1+c_n)]	
5.	Books with prestigious international publishers	(100+c):n	
6.	Books with other international publishers	(40+c):n	
7.	Books with the Romanian Academy or University presses	(20+c):n	
8.	Books with other national publishers	(10+c): n	
9.	Chapters in prestigious international publishers	(50+c):n	
10.	Chapters in volumes with other international publishers	(20+c): n	
11.	Chapters in volumes published by the Academy Publishing House or University presses	(10+c): n	
12.	Chapters in books/volumes with national publishers	(5+c):n	
13.	Editor/Redactor/Coordinator of books with prestigious international publishers	(50+c):n	
14.	Editor/Redactor/Coordinator of books with other international publishers	(30+c):n	
15.	Editor/Redactor/Coordinator of books with national publishers	(20+c): n	
16.	Editor (including guest editor) of WoS-indexed journals	5 X (AIS_1+AIS_2+ ... AIS_n)	
17.	Research projects/grants won through competition	1 point for every 10,000 euros obtained as project director or partner coordinator	
18.	Constant and sustained involvement in	2 points per event	

	scientific activities organized within the institute, including active participation in seminars, workshops, and other internal scientific events (discussions, questions, or feedback provided to colleagues during these events)		

Formula (1):1 x [4+(7xAIS_1)+c1] + 1 x [4+(7xAIS_2)+c2] + ... + 1 x [4+(7XAIS_N)+C_N]
Formula (2):0.7 x [4+(7xAIS_1)+c_1] + 0.7 x [4+(7xAIS_2)+c_2] + ... + 0.7 x [4+(7XAIS_N)+C_N]AIS_1, AIS_2 ..., AIS_N is the factor AIS (*Article Influence Score*), according to *Journal Citation Reports* (published by Clarivate) for the year of publication. For articles published before 2007, the AIS value from 2007 will be used. If the classification for the publication year is not available, the most recent available classification will be considered.
c_1, c_2 ... c_n number of citations (excluding self-citations) for article 1, 2 … N, taken from Web of Science or Scopus at the time of preparing the application file, with the source specified.
c - citations (excluding self-citations) taken from Web of Science or Scopus at the time of submitting the file, with the source specified. A self-citation is considered when the evaluated author cites a previous work in which they were an author.
N - total number of articles in the respective category (excluding abstracts, reviews, obituaries, notes, editorials, corrections, errata).
n - number of authors (editors, redactors, coordinators for the books/chapters edited/prepared).

Parameter	Total score resulting from the calculation of the indicators in Table 1/promotion
Σ_1-2 (international recognition)	Minimum standard: **500 points**. For promotion: **750 points**.
Σ_1-18 (total performance)	Minimum standard: **600 points**. For promotion: **900 points**.

2. ICBP-NS Minimum Standards for the Award of the Professional Grade of CSII

Researchers holding the title of Scientific Researcher III (CS III), with an individual employment contract of indefinite duration, may apply for promotion to a higher professional grade within ICBP-NS, provided that they meet the following criteria:

- they meet all three minimum standards set out in Criteria 1–3;
- they exceed by at least 50% at least two of the three minimum standards.

Promotion is carried out by signing an addendum to the existing individual employment contract.

Criterion 1. Scientific Articles Published after PhD, as Main Author

Minimum standard: The candidate must have published, after obtaining the PhD degree, at least 2 scientific articles in ISI-indexed journals, as main author, which must meet the following conditions:

- The cumulative AIS***** of the two articles must be at least 2.
- At least one article must have been published in the last 5 years, with an *AIS of at least 0.4**.

For promotion (exceeding the minimum standard by at least 50%): The candidate must have published, after obtaining the PhD degree, as main author:

- At least 3 articles in ISI-indexed journals, with a *cumulative AIS* of at least 3**;
- At least 2 articles must have been published in the last 5 years, each with an *AIS* of at least 0.4**.

*****Note:

-The AIS (Article Influence Score), according to https://jcr.clarivate.com/ from the year of publication; for articles published before 2007, the AIS value from 2007 will be used. If the classification from the year of publication is not available, the most recent available classification will be considered.

-The AIS value for the mandatory preliminary conditions is divided according to the formula: AIS/pi, where pi = 1 when the article has 1, 2, or 3 main authors (first, corresponding, and last author), or equals the number of main authors if there are more than 3.

-At least 50% of the published scientific articles must be indexed in Web of Science with the classification "document type: article." This percentage does not include works classified as "document type: review" or multiple combinations such as: "Article; Proceedings Paper," "Article; Book Chapter," etc.

Criterion 2. Coordination of Research Projects/Grants Obtained after PhD**

Minimum standard: After obtaining the PhD degree, the candidate must have coordinated at least one research project or grant (national or international) as project director or partner responsible.

For promotion (exceeding the minimum standard by at least 50%): The candidate must have coordinated at least two research projects or grants (national or international as project director or partner responsible).

Note: For at least one of the coordinated projects, the research team must include a minimum of 3 members**.**

**Note:

-Projects must be obtained: (1)through national or international competition, the link to the competition webpage or other documents proving the competition must be provided, (2)through direct award, non-competitive, in which case the project budget must be equivalent to at least €50,000**.**

-Projects without logistical expenses, grants financed by the candidate's own institution, or grants for congress participation will not be considered.

-Projects must be carried out within an institution conducting research and development activities.

Criterion 3. Quantification of Scientific Activity

Minimum standard: Total score obtained based on the calculation of the indicators in Table 1:**300 points Σ1–2** and **450 points Σ1–18**

For promotion (exceeding the minimum standard by at least 50%): Total score obtained based on the calculation of the indicators in Table 1: **450 points Σ1–2** and **675 points Σ1–18**

1. Parameters Taken into Account and their Quantification Method

No.	*Parameter*	Calculation Method	*Score*
1.	Articles in WoS-indexed journals, as main author	according to the formula (1)	
2.	Articles in WoS-indexed journals, as co-author	according to the formula (2)	
3.	Articles in BDI-indexed journals, as main author	(1+C_1)+(1+C_2)+... (1+C_n)	
4.	Articles in BDI-indexed journals, as co-author	0.7 x [(1+C_1)+(1+C_2)+... (1+c_n)]	
5.	Books at prestigious international publishers	(100+c):n	
6.	Books at other international publishers	(40+c):n	
7.	Books at the Romanian Academy Publishing House or university presses	(20+c):n	
8.	Books at other national publishers	(10+c): n	
9.	Book chapters at prestigious international publishers	(50+c):n	
10.	Book chapters at other international publishers	(20+c): n	
11.	Book chapters at the Romanian Academy Publishing House or university presses	(10+c): n	
12.	Book chapters in volumes at national publishers	(5+c):n	
13.	Editor/redactor/coordinator of books at prestigious international publishers	(50+c):n	

14.	Editor/redactor/coordinator of books at other international publishers	(30+c):n	
15.	Editor/redactor/coordinator of books at national publishers	(20+c): n	
16.	Editor (including guest editor) of WoS-indexed journals	5 X (AIS_1+AIS_2+ ... AIS_n)	
17.	Research projects/grants won through competition	1 point for every €10,000 attracted as project director or partner coordinator	
18.	Constant and sustained involvement in scientific activities organized within the institute, including active participation in seminars, workshops, and other internal scientific events (discussions, questions, or feedback offered to colleagues during these events).	2 points per event	

Formula (1):1 x [4+(7xAIS_1)+c1] + 1 x [4+(7xAIS_2)+c2] + ... + 1 x [4+(7XAIS_N)+C_N]

Formula (2):0.7 x [4+(7xAIS_1)+c_1] + 0.7 x [4+(7xAIS_2)+c_2] + ... + 0.7 x [4+(7XAIS_N)+C_N]AIS_1, AIS_2 ..., AIS_N AIS is the Article Influence Score, according to the *Journal Citation Reports* (published by Clarivate) from the year of publication. For articles published before 2007, the AIS value from 2007 shall be used. If the classification from the year of publication is not available, the most recent available classification shall be considered.

c_1, c_2 ... c_n – the number of citations without self-citations for article 1, 2 …, N, retrieved from Web of Science or Scopus at the time of preparing the file, with specification of the source used.

c – citations without self-citations retrieved from Web of Science or Scopus at the time of submission of the file, with specification of the source used. Self-citation is considered to be the situation in which the evaluated author cites a previous work in which he/she was an author.

N – the total number of articles in the respective category (excluding abstracts, reviews, commemorations, notes, editorials, corrections, errata).

n – the number of authors (editors, reviewers, coordinators for the books/chapters edited or prepared).

Parameter	Total score resulting from the calculation of the indicators in Table 1/promotion
Σ_1-2 (international recognition)	Minimum standard: **300 points**. For promotion: **450 points**.
Σ_1-18 (total performance)	Minimum standard: **450 points**. For promotion: **675 points**.

3. ICBP-NS Minimum Standards for Awarding the Professional Title of CSIII

Scientific Researchers (CS) with an indefinite-term individual employment contract may take the examination for promotion to a higher professional grade within ICBP-NS, provided they meet the following criteria:

- they must fulfill all three minimum standards specified under Criteria 1–3;
- they must exceed by at least 50% at least two of the three minimum standards.

Criterion 1. Scientific articles published

Minimum standard: The candidate must have published at least 5 scientific articles in ISI-indexed journals, either as principal author or co-author.

For promotion (by exceeding the minimum standard by at least 50%): At least 8 ISI-indexed articles must be published, as principal author or co-author.

Criterion 2. Scientific articles published with a cumulative AIS of at least 2

Minimum standard: The candidate must have published **at least 2 articles** in ISI-indexed journals, with a cumulative AIS* of at least 2.

For promotion (by exceeding the minimum standard by at least 50%): The candidate must have published at least 3 articles in ISI-indexed journals, with a cumulative AIS* of at least 3.

**Note:*

-The AIS (Article Influence Score) factor is taken from https://jcr.clarivate.com/ for the year of publication. For articles published prior to 2007, the 2007 AIS value shall be used. If the classification for the publication year is not available, the most recent available classification will be taken into consideration.

-The AIS value for mandatory preliminary conditions is fractionalized according to the formula: AIS/pi, where pi = 1 if the article has 1, 2, or 3 principal authors (namely the first author, the last author, and the corresponding author), or equals the number of principal authors if there are more than 3.

-At least 50% of the scientific articles published must be listed in Web of Science under the "document type": "article". This percentage does not include works categorized as "document type": "review" or multiple combinations such as "Article; Proceedings Paper", "Article; Book Chapter", etc.

Criterion 3. Quantification of scientific performance

Minimum standard: Total score resulting from the calculation of the indicators in Table 1: **100** points Σ_1-2 and **150** points Σ_1-17.

For promotion (by exceeding the minimum standard by at least 50%): Total score resulting from the calculation of the indicators in Table 1: **150** points Σ_1-2 and **225** points Σ_1-17.

Table 1. Parameters taken into account and their method of quantification

No.	*Parameter*	Calculation Method	*Score*
1.	Articles in WoS-indexed journals, as main author	according to the formula (1)	
2.	Articles in WoS-indexed journals, as co-author	according to the formula (2)	
3.	Articles in BDI-indexed journals, as main author	(1+C_1)+(1+C_2)+... (1+C_n)	
4.	Articles in BDI-indexed journals, as co-author	0.7 x [(1+C_1)+(1+C_2)+... (1+c_n)]	
5.	Books published by prestigious international publishers	(100+c):n	
6.	Books published by other international publishers	(40+c):n	
7.	Books published by the Romanian Academy Publishing House or by University presses	(20+c):n	
8.	Books published by other national publishers	(10+c): n	
9.	Chapters in volumes published by prestigious international publishers	(50+c):n	
10.	Chapters in volumes published by other international publishers	(20+c): n	
11.	Chapters in volumes published by the Romanian Academy Publishing House or University presses	(10+c): n	
12.	Chapters in books/volumes published by national publishers	(5+c):n	
13.	Editor/redactor/coordinator of books published by prestigious international publishers	(50+c):n	
14.	Editor/redactor/coordinator of books published by other international publishers	(30+c):n	
15.	Editor/redactor/coordinator of books published by national publishers	(20+c): n	
16.	Editor (including guest editor) of WoS-indexed journals	5 X (AIS_1+AIS_2+ ... AIS_n)	
17.	Consistent and sustained involvement in scientific activities organized within the institute, including active participation in seminars, workshops, and other internal scientific events (discussions, questions, or feedback offered to colleagues during these events).	2 points per event	

Formula (1):1 x [4+(7xAIS_1)+c1] + 1 x [4+(7xAIS_2)+c2] + ... + 1 x [4+(7XAIS_N)+C_N]
Formula (2):0.7 x [4+(7xAIS_1)+c_1] + 0.7 x [4+(7xAIS_2)+c_2] + ... + 0.7 x [4+(7XAIS_N)+C_N]AIS_1, AIS_2 ..., AIS_N **AIS** is the *Article Influence Score*, according to the Journal Citation Reports (published by Clarivate) for the year of publication. For articles published before 2007, the 2007 AIS value shall be used. If the classification for the year of publication is unavailable, the most recent available classification shall be considered.
c_1, c_2 ... c_n — the number of citations excluding self-citations for article 1, 2 …, N, retrieved from Web of Science or Scopus at the time of preparing the file, with the source specified.
c — citations excluding self-citations, retrieved from Web of Science or Scopus at the time of submitting the file, with the source specified. A self-citation is considered to be the situation in which the evaluated author cites a previous work in which they were an author.
N — the total number of articles in the respective category (excluding abstracts, reviews, commemorations, notes, editorials, corrections, errata).
n — the number of authors (editors, redactors, coordinators for the books/chapters edited or prepared).

Parameter	Total score resulting from the calculation of the indicators in Table 1/promotion
Σ_1-2 (international recognition)	Minimum standard: **100 points**. For promotion: **150 points**.
Σ_1-17 (total performance)	Minimum standard: **150 points**. For promotion: **225 points**.

4. Minimum Standards for Awarding the Professional Grade of CS

Minimum criteria for participation in the CS competition:

1. **Graduate with a bachelor's or diploma degree** from long-term higher education studies, or holder of a master's degree in the specialty or related fields (competition requirement only);
2. **Status of PhD candidate or PhD** holder in the specialty of the position's discipline or in a related field (competition requirement only);
3. At least two **letters of recommendation** from supervisors and/or course professors (competition requirement only);
4. **One scientific article published** in an ISI-indexed journal as co-author in position 2 or 3, or in a BDI-indexed journal as first author (competition requirement only).

5. Minimum Standards for Awarding the Professional Grades of ACS

Minimum criteria for participation in the ACS competition:

1. Graduate with a **bachelor's or diploma degree** from long-term higher education studies, or holder of a master's degree in the specialty or related fields (competition requirement only);

2. At least two **letters of recommendation** from supervisors and/or course professors (competition requirement only).

Approved at the meeting of the Scientific Council of ICBP-NS on 07.08.2025

Director ICBP N. Simionescu **26.06.2025**

Acad. Maya Simionescu

Documents Used for Drafting and Developing this Regulation:

Ministerial Orders no. 6129/2016 and 3019/2025 regarding the approval of minimum standards (for awarding the professional grades of Scientific Researcher II and Scientific Researcher I); Government Decisions no. 1568/2024 and 1569/2024;Methodological Norms approved by the Bureau of the Presidium of the Romanian Academy, regarding the organization of the promotion examination for obtaining a professional grade by CDI personnel / July 2025; Methodology for verification and evaluation of the files containing the documents related to the competition, respectively the examination, for awarding the professional grades of CSII and CSI; Law no. 183/2024 on the status of CDI personnel.

Annexes useful for preparing the application file for registration in the promotion exam (candidate):

Annex DP: Documents required for registration (application file) for the promotion exam and the List of documents included in the exam file for obtaining the professional grades of CSII and CSI (according to **ANNEX 1 to the Methodology**, Methodological Norms on organizing the promotion exam for obtaining professional CDI grades in AR institutes);

Annex L: Procedural steps for creating links to the supporting/justifying documents from the index (according to **ANNEX 3 to the Methodology**, Methodological Norms on organizing the promotion exam for obtaining professional CDI grades in AR institutes);

Annex 1P: Application form for registration to the exam – model (according to **ANNEX 5 to the List**, Methodological Norms on organizing the promotion exam for obtaining professional CDI grades in AR institutes);

Annex 2P: Exam file cover – model (according to **ANNEX 1 to the List**, Methodological Norms on organizing the promotion exam for obtaining professional CDI grades in AR institutes);

Annex 3P: Candidate's statement on own responsibility – model (according to **ANNEX 3 to the List**, Methodological Norms on organizing the promotion exam for obtaining professional CDI grades in AR institutes);

Annex 4P: Consent statement regarding the processing of personal data, in accordance with Regulation (EU) 2016/679 – model (according to **ANNEX 4 to the List**, Methodological Norms on organizing the promotion exam for obtaining professional CDI grades in AR institutes);

Annex 5P: Verification sheet for meeting the specific standards of the position/professional grade.

Annexes useful for the evaluation process of the files (committees, ICBP-NS):

Annex 1E: Evaluator's declaration – model (according to **ANNEX 2 to the Methodology**, Methodological Norms on organizing the promotion exam for obtaining professional CDI grades in AR institutes);

Annex 2E: Evaluation report (committee member) – model (according to **ANNEX 3 to the List**, Methodological Norms on organizing the promotion exam for obtaining professional CDI grades in AR institutes).

Annex DP

Documents required for registration in the promotion exam

a. application form for registration in the exam, to which is attached a sworn statement regarding the accuracy of the information presented in the file, completed and signed in original by the candidate (Annex 1P and Annex 3P);
a. curriculum Vitae in EUROPASS format signed by the candidate (Annex 3), which must mandatorily include:
i. completed studies and diplomas obtained;
ii. professional experience and relevant previous positions held;
iii. research, development, and innovation projects led as project director and the grants obtained, if applicable, specifying for each the source of funding, the funding volume, and the main resulting publications or invention patents;
iv. awards or other elements of recognition of scientific contributions;
v. a narrative description of the 3 most important achievements since the last promotion – maximum 3 pages;

b. list of publications, works, articles/studies, patents of invention selected by the candidate according to their relevance to the candidate's scientific research activities, signed in original by the candidate (Annex 4). The list must mandatorily include:
i. a list of up to 10 most relevant scientific publications, such as authored books, articles/studies/chapters, edited volumes, works;
ii. the list of invention patents and other industrial property titles;
iii. the list of authored books and edited/published volumes;
iv. the list of full-text articles/studies published in journals from the main international scientific stream;
v. the list of other scientific works and contributions;

c. verification sheet of compliance with the organization's own standards, completed and signed by the candidate (Annex 5P);
d. copy of the identity document or any other document that certifies identity, as provided by law, certified by the candidate as conforming to the original, with full name and signature;
e. copy of the marriage certificate or proof of name change, if applicable, certified by the candidate as conforming to the original, with full name and signature;
f. Medical certificate attesting appropriate health status, issued by the candidate's family physician or by authorized medical institutions no more than 3 months prior to the exam;
g. Signed consent statement for the processing of personal data (Annex 4P);
h. Criminal record certificate;
i. Copy of the PhD diploma; if the diploma was not issued by a higher education institution in Romania, a copy of the recognition or equivalence certificate must be submitted, certified by the candidate as conforming to the original, with full name and signature;
j. Sworn statement declaring that, in the last 3 years prior to registering for the promotion exam, the candidate has not been sanctioned for committing a serious breach of good conduct in CDI activity as provided by art. 52 para. (8) of Law no. 183/2024, completed and signed by the candidate (Annex 3P).

The documents must be submitted both in physical format and in electronic format (each document from the physical file will be scanned according to the index and saved on a memory stick) at the ICBP-NS headquarters, as well as sent to the e-mail address indicated in the announcement.

The exam file for the position of CSII or CSI consists of two parts:
a) administrative file **–** includes the documents listed under points a–j and the documents issued during the course of the exam. All documents are registered, each document is assigned a link (according to the procedural steps set out in Annex L), indexed and numbered, then scanned in the order listed in the *"List of documents included in the competition/exam file"* provided in Annex DP;
b) scientific works portfolio – the works are scanned in PDF format, each document is assigned a link, then numbered and indexed.

LIST
of the documents included in the exam file for obtaining the professional research-development grades of CSII and CSI

The documents listed below must be filed in electronic format (PDF)**,** as separate files, attached in the order indicated in the index. Documents must be numbered according to the index.

The exam file is submitted only in complete form, containing all documents required for the position the candidate applies for, in the order indicated below. The introduction of false information or non-compliant documents in the exam file is sanctioned under legal provisions.

The standard cover form must be completed by the candidate, according to Annex 2P.

Each exam file for the awarding of the professional grades CSII and CSI will include the following documents:

A. Administrative File

1. Cover letter for each file from the management of the research institutes/research centers/branches of the Romanian Academy to the Romanian Academy, containing: candidate's full name, current scientific grade, the organization to which the candidate belongs or which organizes the exam, the scientific grade applied for, the targeted field of the position – specialty commission – fundamental and associated field, number of file pages, registration number, and contact details of the issuing person/institution for details/information and for transmission of evaluation results.
2. Index of the documents in the file, indicating the page where each document is found, with links attached, according to Annex L.
3. Report presenting the exam, approved by the management of the organizing institution, including:

   -the stages of the exam shall be presented – from the publication of the exam announcement (date of announcement, where it was published), the decision appointing the exam commission and the appeals commission, the evaluation results, up to the validation of the results in the scientific council.

   -the field and the Scientific Section of the Romanian Academy responsible for evaluating the candidate's file shall be indicated.

   -reference shall be made to the institution's website containing the exam regulations for CSI and CSII positions/grades, as approved by the management of the organizing institution.

4. Extract from the minutes of the scientific council meeting – date, members present, approval of exam results.
5. Extract from the scientific council meeting regarding approval of organizing the promotion exam for institutes/research centers of the Romanian Academy. For Academy Branches: approval of the Branch President/Branch Executive Board, following the scientific council's endorsement of proposals from subordinate institutes.
6. Report of the exam commission, drafted in compliance with legal provisions, including all stages of the promotion exam.
7. Assessment reports of the members of the promotion exam commission for obtaining the CSII or CSI grade (Annex 2E) and sworn statement (Annex 1E). Both documents must be signed, dated, and registered at the ICBP-NS secretariat.
8. Decision appointing the exam and appeals commissions, indicating function, university or research grade, full name, and workplace of each member.
9. Application for registration in the exam, registered, signed, and dated by the candidate, approved by the head of the research and innovation organization, and endorsed by its legal department (Annex 1P).
10. Verification sheet of compliance with the standards specific to the position/grade applied for, completed and signed by the candidate and endorsed by the research organization, in line with legal provisions. Only published works (with volume, number, pages, and/or DOI) are considered. The sheet must be structured to allow verification, with parallel columns showing the minimal standards required and the candidate's results (Annex 5P).
11. Career development proposal regarding scientific research activities, maximum 5 pages.
12. Statement of responsibility, handwritten and signed by the candidate, including identification data, declaring that the data in the file refer to their own activities and results. The candidate accepts responsibility for any false statements, and for ensuring the originality of the scientific portfolio and compliance with quality and professional ethics standards (Annex 3P).
13. Consent form for the processing of personal data, according to Regulation (EU) 2016/679 (Annex 4P).
14. Curriculum Vitae in EUROPASS format (PDF), dated and signed by the candidate.
15. Information on awards or other forms of recognition of the candidate's scientific contributions.
16. Proof of studies – copies of degree diplomas (Bachelor's, Master's, PhD, as applicable), certified "true to the original." If the candidate does not hold a diploma issued by a Romanian higher education institution, they must submit a certified copy of the recognition/equivalence certificate before employment and contract signing, otherwise the appointment act will not be issued.
17. Proof of identity:
    a) copy of birth certificate;
    b) if applicable, copy of the document certifying name change (marriage certificate or proof of change);
    c) copy of ID card or another legal identity document.
18. Criminal record certificate.
19. Medical certificate issued by the candidate's family doctor.
20. Copy of the promotion exam announcement, posted at the institution's headquarters and on the organizing institution's website.

B. Portfolio of Scientific Works

The list of scientific publications (grouped by category), works, articles/studies, patents considered relevant by the candidate for the applied position, for their own research activities, and for research projects (contract/grant-based), including citations.

The list is structured as follows:
a) doctoral thesis (or theses);
b) list of the 10 most relevant scientific publications (books, articles/studies/chapters, edited volumes);
c) list of invention patents and other industrial property titles;
d) list of authored books and edited/published volumes;
e) list of full-length articles/studies published in mainstream international scientific journals;
f) list of other scientific works and contributions (or, where applicable, in the field of artistic creation or national defense);
g) research-development-innovation projects (contract/grant-based);
h) other works.

NOTE:

All documents in the file must be registered at the secretariat of the organizing unit. For all copies, the phrase “certified true to the original” must be written, signed, and dated.

Annex L

Procedural steps for creating hyperlinks to the supporting/justifying documents listed in the index (opis):

A. Initial copying of the index (opis) and documents onto a USB drive

B. To assign a hyperlink to each document listed in the index, proceed as follows:

1. Select the text to which you wish to add the hyperlink.
2. In the *Insert* menu → click the *Link* icon [or press the keys Ctrl + K simultaneously].
3. In the *Insert Hyperlink* window, select (by clicking) the document to which you want to create the link.
4. Click *OK*.
5. After inserting the hyperlink, check the connection by pressing Ctrl and simultaneously clicking (Ctrl+Click).

After saving the document as a PDF, the hyperlinks should be functional.
Once all hyperlinks are finalized, verify their functionality.

(Header)

Annex 1P

No...../.....

Approval

Director of ICBP-NS,

APPLICATION FOR REGISTRATION TO THE EXAMINATION

Madam Director,

The undersigned, ..., graduate of ....., appointed to the position of ..... at the "Nicolae Simionescu" Institute of Cellular Biology and Pathology, e-mail address ....., mobile phone number ....., respectfully request approval for my registration in the examination for promotion to the professional grade of Research Scientist ....., full-time, on an indefinite basis, within the Department of ..... of the ..... Institute, specialization ....., subfield ..... .

I hereby state that I hold a doctoral degree and have professional seniority of ..... years in the field.

The announcement regarding the competition was published on ..... (date and location)..... (only if applicable).

Date: ..... Signature: .....

(Form code and page number – footer)

(Header)

Annex 2P

EXAM FILE COVER PAGE

Research Institute / Research Center / Branch of the Romanian Academy

Position: Research Scientist, grade .....

EXAM FILE

Candidate:
(Name and surname, scientific title) .....

Phone: **.....**

(Form code and page number – footer)

(Header)

To be completed by each candidate

Annex 3P

STATEMENT ON OWN RESPONSIBILITY

I, the undersigned, ..., employee of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", in the position of ....., born on ....., residing in ....., str. ..... no. ...., county ....., Personal Identification Number (CNP) ....., ID/Passport series ..... no. ....., being aware of the provisions of Article 326 of the Penal Code regarding false statements, hereby declare, on my own responsibility, that the documents and data contained in the file submitted for the position of ....., in the field of ....., at the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", represent my own achievements and activities. I acknowledge that, otherwise, I shall bear the consequences of making a false statement, in accordance with the legislation in force.

Furthermore, I declare on my own responsibility that, in the last 3 years prior to registering for the promotion examination, no disciplinary sanction has been applied to me regarding serious violations of good conduct in research, development and innovation (RDI) activities, as provided in Art. 52 para. (8) of Law no. 183/2024.

Date
.....

Signature

……

1. The statement must be signed either by hand or with a certified electronic signature.
2. The name, father's initial, and surname must be written in CAPITAL LETTERS.

NOTE:
Art. 326 – False statements
"(1) The misrepresentation of the truth, made to a person referred to in Article 175 or to a unit in which such person carries out their activity, in order to produce a legal consequence, for oneself or for another, when, according to the law or circumstances, the statement made serves to produce that consequence, shall be punishable by imprisonment from 6 months to 2 years or by a fine. (...)"

(Form code and page number – footer)

(Header)

To be completed by each candidate

Annex 4P

DECLARATION OF CONSENT
regarding the processing of personal data, pursuant to Regulation (EU) 2016/679

I, the undersigned, ..., residing in ....., born on ..... in the locality of ....., county of ....., holder of ID card series ... no. ....., issued on ..... by ....., with Personal Numeric Code (CNP) ....., as a participant in the promotion examination held on ..... at ....., organized by the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", hereby declare that I consent to the use and processing of my personal data by the staff designated by the Ministry, including the communication of such data, if necessary, to other entities (the National Commission for the Certification of Titles, Diplomas and University Certificates, the Consultative College for Research, Development and Innovation, etc.).

I have been informed of the provisions of Regulation (EU) 2016/679 on the protection of natural persons with regard to the processing of personal data and on the free movement of such data, repealing Directive 95/46/EC (General Data Protection Regulation), adopted by the European Parliament and the Council of the European Union, namely:
— the right of access, under which the person has the right to obtain confirmation from the National Authority for Research (ANC) as to whether or not personal data are being processed, and, if so, to obtain access to such data and to information regarding the way they are processed;
— the right to data portability, i.e., the right to receive personal data in a structured, commonly used format, and the right to have such data transmitted directly to another controller, where technically feasible;
— the right to object, meaning the right of the person to oppose the processing of personal data;
— the right to rectification, meaning the correction, without undue delay, of inaccurate personal data;
— the right to erasure of data ("right to be forgotten"), meaning the right of the person to request that their personal data be erased without undue delay, where one of the following grounds applies: the data are no longer necessary for the purposes for which they were collected or processed; the person withdraws consent and there is no other legal basis for processing;
— the right to restriction of processing, which may be exercised where the person contests the accuracy of the data, for a period enabling the institution to verify their correctness; or where the processing is unlawful, and the person opposes the erasure of the data, requesting instead the restriction of their use.

I acknowledge that my refusal to provide the personal data requested by the ANC will make it impossible to establish the legal relations necessary for the promotion process and that the above-mentioned institution cannot be held liable in this regard.

If the personal data provided are incorrect or subsequently change (change of residence, civil status, e-mail address, etc.), I undertake to inform the ANC in writing, in due time.

I have also been informed that such data will be treated confidentially, in accordance with the provisions of Regulation (EU) 2016/679 of the European Parliament and of the Council of 27 April 2016 on the protection of natural persons with regard to the processing of personal data.

Date: ..... Signature: .....

To be completed by each candidate

Annex 5P

Checklist for Verifying Compliance with the Specific Standards of the Position

for the professional grade _____

No.	**Criterion/Standard**	**Minimum Standard**	**Fulfilled Standard Value**

This form shall be completed in accordance with the minimum standards of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" for awarding professional grades, as provided in Annex SC of the *Procedure on the Recruitment, Selection, and Promotion of CDI Staff within ICBP-NS*.

Date.....

Name and Surname.....
Signature.....

(Footer: form code and page no.)

(Header)

Evaluator's Declaration

Annex 1E

DECLARATION

I, the undersigned ....., with academic rank/scientific title ....., being involved in the procedure for evaluating the examination files for promotion to the professional grade of ..... at the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", hereby acknowledge that I am aware of the legal provisions in force regarding the incompatibilities of persons involved in the examination procedure and, under the penalty of the Criminal Code for false statements, I hereby declare on my own responsibility that I am not in such a situation.

Date: ..... Signature: .....

(Footer: form code and page no.)

(Header)

To be completed by each member of the examination committee

Annex 2E

ASSESSMENT REPORT

regarding the examination for obtaining the professional grade of CS.....

I, the undersigned ....., academic/research title ....., at ....., appointed by Decision of the Director/Rector no. ..... dated ..... as a member of the examination/appeals committee for obtaining the professional grade of Scientific Researcher ..... at the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu", following the evaluation of the data presented in the examination file and the tests undertaken by the candidate ....., have found the following:

1. Fulfillment of the minimum standards and the ICBP-NS specific standards:
   .....
   .....
   Grade:
2. Evaluation of the candidate's previous scientific activity:
   .....
   .....
   Grade:
3. Evaluation of the application file and the candidate at the interview:
   .....
   .....
   Grade:
4. Results obtained – degree of fulfillment of the criteria:
   .....
   .....
   Grade:
5. Conclusions:
   .....
   .....
   Grade:

Date: ..... Signature: .....

(Form code and page number – footer)

REGULATIONS

regarding the organization of the competition for filling vacant research staff positions within the Institute of Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" Cellular of the Romanian Academy

-Edition 1, Revision 1-

Chapter I. General provisions

Article 1. This Regulation establishes the methodology for filling vacant research positions, differentiated by professional grade, for personnel involved in research, development and innovation (RDI) activities, within the "Nicolae Simionescu" Institute of Cellular Biology and Pathology (IBPC-NS) of the Romanian Academy.

Article 2. Vacant positions are filled through a competition organized in accordance with the provisions of Law 53/2003 on the Labor Code, Law 183/2024 on the Status of RDI personnel, Order of the Ministry of National Education and Scientific Research No. 6129/20.12.2016, Methodological Norms on the organization of competitions for filling vacant RDI personnel positions issued by the Romanian Academy on July 15, 2025 and in accordance with this regulation approved at the IBPC-NS level, approved by the Biological Sciences Section and published on the institute's website.

Article 3. The Regulation applies to all persons who wish to occupy in IBPC-NS, for a fixed or indefinite period, one of the following research and development positions and professional ranks, defined according to Law 183/2024 and maintaining the equivalence with the professional ranks provided for in the European Charter for Researchers, as follows:

(i) scientific researcher grade I (CSI), equivalent to senior principal researcher R4, holding doctorate;
(ii) scientific researcher level II (CSII), equivalent to senior researcher R3, holding doctorate;
(iii) scientific researcher level III (CSIII), equivalent to recognized researcher R2, holding doctorate;
(iv) scientific researcher (CS), equivalent to the R1 beginner researcher, holding a doctorate or having the status of a doctoral student;
(v) scientific research assistant (ACS), equivalent to a licensed scientific research assistant.

Article 4. The recruitment of RDI personnel to positions is carried out through a competition, organized on the basis of the following principles:

a. the principle of transparency, competence, gender equality, non-discrimination and equal and fair access to filling vacant positions;
b. the principle of ensuring the quality and professional training of research staff;
c. correct and complete information regarding the organization and conduct of the competitions;
d. transparency regarding administrative, financial and evaluation information of research positions according to the legislation in force.

Article 5.

(1) Employment in vacant research positions with an individual employment contract, for an indefinite or fixed period, is possible only for the candidate declared the winner following the organized competition.

(2) Employment for participation in research projects, projects in the field of education and vocational training or in any other types of projects, regardless of the funding source, may be made for a fixed period, at most equal to the duration of the respective project, without going through other prior formalities and/or selection processes, for the staff nominated in the staff lists, corresponding to the rank held, as members of the project team, as well as for the staff of the research organization. In the case of staff from IBPC-NS, employment within a project is carried out based on the decision of the Director, by concluding an individual employment contract. The salary is granted within the limit of the available funds, according to the provisions of the funding contract/funder's rules. IBPC-NS may refuse to conclude an individual employment contract, as the case may be, with persons from outside the institution who have been nominated, without the prior consent of the research organization, in the personnel lists, as members of a research project team, a project team in the field of education and vocational training or any other type of project team.

(3) All persons who do not hold the professional degree in research and development corresponding to the position for which they are applying and who meet the own standards established by IBPC-NS may participate in the competition for a vacant research position. Also, all persons who hold the professional degree in research and development corresponding to the position for which they are applying and who meet the additional standards specific to IBPC-NS may participate, whether or not they are already included in the national R&D system, without any discrimination, under the conditions of the law.
The filling of research positions, through competition, by research, development and innovation staff, hereinafter referred to as RDI staff, is the responsibility of IBPC-NS in compliance with these methodological rules, as well as the general principles and conditions provided for by the European Charter for Researchers.

Chapter II. Minimum training requirements

Article 6. IBPC-NS organizes a competition to fill one or more CDI positions only if they are vacant and based on a substantiation note proposing to put the position up for competition.

Article 7. Only graduates of accredited higher education institutions, who have long-term higher education, graduated with a bachelor's degree or equivalent, or equivalent higher education (bachelor's and master's studies according to Law 288/2004) and who meet the provisions of Law no. 183/2024 regarding the necessary conditions for registration, para. (10-11), the minimum standards specific to each scientific field, para. (1), but also the additional standards established and approved within the IBPC-NS of the Romanian Academy (according to Annex SC.C) may register for the competition.

Article 8. Only persons who meet the following general conditions may participate in the contest:

a. have Romanian citizenship, citizenship of other European Union member states or of the states belonging to the European Economic Area and domiciled/residing in Romania;
b. have the minimum age regulated by legal provisions;
c. have full capacity to exercise;
d. have a state of health appropriate to the position for which they are applying, certified on the basis of a medical certificate issued by the family doctor or by the authorized health units;
e. meet the specific conditions of the position being advertised;
f. have not been definitively convicted of committing a crime against humanity, against the state or against authority.

Article 9. According to Law 183/2024 on the Status of CDI personnel (for the professional grades ACS, CS and CSIII) and the Order of the Ministry of National Education and Scientific Research no. 6129/20.12.2016 (for the professional grades CSII and CSI), minimum standards are established the obligations that must be fulfilled by people participating in the competition to obtain a CDI position.

(1) For the ACS professional degree, the minimum mandatory standards are the following:
a. be a graduate with a bachelor's degree or a diploma of long-term university studies, or graduate with a master's degree in the specialty or a related field;
b. at least two letters of recommendation from supervisors and/or course teachers.

(2) For the professional degree CS, the minimum mandatory standards are the following:
a. meet the conditions for obtaining the ACS degree; b. be enrolled in doctoral school or hold a doctorate in the specialty or fields related.

(3) For the professional degree CSIII, the minimum mandatory standards are the following:
a. to hold a doctorate in the specialty or related fields;

b. at least five articles published in journals indexed in international databases (excluding Google Scholar);
c. at least one paper presented at an international conference.

(4) For the professional degrees CSII and CSI, the minimum mandatory standards are the following:
a. to hold a doctorate in the specialty or related fields;
b. the minimum standards approved by order of the Minister of Education and Research;
c. to hold the qualification certificate (to obtain the CSI degree).

Article 10. The criteria based on which the minimum standards for occupying the positions and professional ranks of the CDI staff of IBPC-NS are developed are the following:
a. the results of research and/or innovation activity;
b. the impact of research and/or innovation activity;
c. the ability to attract research funds or to collaborate with public and/or private research organizations;
d. professional prestige;
e. organizational capacity;
f. international cooperation capacity.

Chapter III. General framework for organizing the competition

Article 11.

(1) IBPC-NS organizes a competition to fill one or more CDI positions only if they are vacant and based on a substantiation note proposing to put the position out to competition.

(2) A position is considered vacant if it is so provided in the annual staff list or if it is vacant during the year.

(3) The position is vacant in one of the following ways:
a. termination of the individual employment contract of the person occupying the position, under the law;
b. the transfer of the person occupying the position to another position within the same organization research, as a result of winning a competition;
c. by suspending the individual employment contract of the person occupying the position, in this case, the temporarily vacant position may be filled for a fixed period until the holder returns to the respective position.

Article 12. The competition procedure is initiated by IBPC-NS only after the Scientific Council approves the organization of the competition.

Article 13. Calendar of competitions for filling vacant positions:
a. the substantiation note is drawn up proposing the opening of the position to competition and is submitted for approval to the Scientific Council of IBPC-NS;
b. after receiving approval, the competition is announced publicly, by posting on the IBPC-NS website and by publishing on https://posturi.gov.ro/.ro;

c. the composition of the competition/appeals committee is established within 5 days of the approval of the competition organization and the schedule, and the decisions to appoint members and designate committee chairmen are drawn up;
d. the available period for submitting the competition file is 30 days (for permanent positions) from the date of publication of the announcement;
e. the competition files are sent to the president of the competition committee;
f. Candidates who have obtained at least an average of 8 and no grade are admitted and can be recommended. sub 7;
g. within 1 working day from the date of publication of the competition result, candidates have the right to file an appeal;
h. appeals are resolved within 2 working days of their registration;
i. the final report of the competition, after approval by the Scientific Council, is submitted to Director;
j. within 2 working days from the end of the competition, the final result of the competition is published the competition;
k. The winning competition files are submitted to the Biological Sciences Section within 10 calendar days from the end of the competition;
l. the competition procedure must be completed by the commission within 15 days from the date of registration, and the final report and the complete file must be submitted to the Presidium of the Romanian Academy within 45 days from the same date.

Chapter IV. Publication of the announcement regarding the organization of the competition

Article 14. The competition is publicly announced by posting at the IBPC-NS headquarters, on the IBPC-NS website (www.icbp.ro) and on the website https://posturi.gov.ro/.ro, and can also be distributed on other national and international online platforms, or in printed form in various locations for increased visibility. All announcements contain elements relating to the deadline for submitting applications, the IBPC-NS website and the contact details of the IBPC-NS secretariat, from where any additional information regarding the competition can be obtained.

Article 15. Simultaneously with the publication of the competition announcement, the standard forms (application for registration for the competition, Annex 1A, proposal for scientific career development, Annex 5 and sheets for verifying the fulfillment of the research organization's own standards, are also published on the IBPC-NS website. Annexes 5A, 5A.1-5A.3 and 5Aa) and the following elements: a.
brief description of the position for which the competition is being organized (position, COR code, duration individual employment contract, specific duties);
b. the minimum salary corresponding to the position;
c. the topic and bibliography of the competition tests;
d. complete list of documents that make up the competition file;
e. the address to which the competition file can be sent (in physical or electronic format);

f. the organization of the competition (written and/or oral test);
g. the day, time and place of the competition;
h. the calendar/description of the competition procedure.

Chapter V. Competition registration

Article 16. Registration for the competition is made within 30 calendar days from the date of publication of the announcement, by submitting a file by the candidate both in physical format, at the IBPC-NS headquarters, and in electronic format (on a memory stick at the IBPC-NS headquarters and to the e-mail address indicated in the announcement).

Article 17. The file must contain the following documents also provided in Annex DA (each document in the physical file will be scanned according to an inventory, Annex 6A and saved on a memory stick):

a. the signed application for registration for the competition, to which is attached a declaration on one's own responsibility by which the candidate attests to the veracity of the information presented in the file (Annex 1A and Annex 3A);
b. proposal for the development of the scientific career from the point of view of scientific research activities (Annex 5), of maximum 5 pages, signed (for CSI, CSII, CSIII);
c. curriculum vitae according to the EUROPASS model signed by the candidate (Annex 3), which must contain: i. studies completed and diplomas obtained; ii. professional experience and relevant jobs previously held; iii. research, development and innovation projects led as project director and grants obtained, if applicable, indicating for each funding source, the volume of funding and the main publications or patents resulting; iv. awards or other elements of recognition of scientific contributions; v. narrative description of the 3 most important achievements since the last promotion - maximum 3 pages;
d. list of publications, works, articles/studies, patents selected by the candidate based on their relevance to their own scientific research activities, signed in original by the candidate (Annex 4). The list must necessarily contain: i. list of no more than 10 scientific publications, the most relevant, such as: author's books, articles/studies/ chapters, edited volumes, works; ii. list of patents and other industrial property titles; iii. list of author's books and edited and published volumes; iv. list of articles/studies in extenso, published in journals from the main international scientific flow; v. list of other scientific works and contributions;
e. verification sheet of compliance with the research organization's own standards, completed and signed by the candidate (Annexes 5A), except for the situation regulated in letter f;
f. proof of holding the professional research and development degree corresponding to the position for which they are applying, the verification form of meeting the research organization's own standards, completed and signed by the candidate, only for candidates who hold the professional research and development degree of CS II or CS I corresponding to the position for which they are applying

run for office;

g. copy of the bachelor's degree or equivalent/master's degree/doctorate, as the case may be. In the event that the candidate declared the winner does not hold a diploma issued by a higher education institution in Romania, he/she must submit a copy of the original of the certificate of recognition or equivalence thereof before being hired and signing the individual employment contract, under penalty of not issuing the administrative act of hiring for the position;

h. copy of the identity card or any other document attesting identity, according to the law, as the case may be, certified by the candidate according to the original, the name in clear print and the signature;

i. copy of the marriage certificate or proof of name change, as applicable, certified by the candidate according to the original, the name in print and the signature;

j. medical certificate attesting to the candidate's appropriate health status, issued by the candidate's family doctor or by the authorized health units no later than 3 months prior to the competition;

k. signed declaration of consent for the processing of personal data (Annex 4A);

l. criminal record certificate;

m. birth certificate, certified by the candidate as being in accordance with the original, the name clearly and signature.

The competition file for the position of CSI, CSII consists of 2 parts (the administrative file and the folder with scientific papers), and the documents contained (according to Annex DA) will be assigned a link according to the procedural steps in Annex L.

Article 18. The secretary of the competition committee registers the competition file, communicates the registration number to the candidate and transmits the file to the members of the competition committee, under the conditions established by the competition regulations.

Article 19. The secretary of the competition committee shall verify whether the competition file is complete on the day of its receipt and registration. In the event that the competition file is incomplete, the secretary of the competition committee shall request clarifications from the candidate, and the candidate may complete the competition file until the date on which the period for submitting competition files expires.

Article 20. In exercising the duties provided for in Articles 18 and 19, the secretary of the competition committee collaborates with the human resources manager, under the conditions provided for in the competition committee's own regulations. contest.

Chapter VI. Competition committee and appeals resolution committee

Article 21. Within 5 days of the approval of the organization of the competition and the schedule of its implementation, the nominal composition of the competition commission and the one for resolving complaints shall be established, for each vacant position for which a competition is organized, following the proposals

the scientific director/secretary, approval by the Scientific Council of IBPC-NS and endorsement by the Biological Sciences Section of the Romanian Academy.

Article 22.

(1) The members of the competition committee and those of the appeals resolution committee are scientific researchers or university teachers with a professional degree or university teaching title at least equal to the professional degree for which the competition is organized and are specialists in the field of the vacant position's disciplines or in related fields.

(2) The members of the competition committee cannot be part of the appeals resolution committee.

(3) The persons involved in the competition procedure are: a. participating

in the decision-making process regarding the appointment of the competition committee and the selection committee.

resolution of complaints;

b. participates in the professional or administrative evaluation within the competition.

(4) Persons who are spouses, relatives or in-laws up to the third degree inclusive in relation to the candidate in the competition for a vacant position may not be involved in the competition procedure.
research.

Article 23. The composition of the competition committee is appointed by administrative act of the director of IBPC-NS and is composed of:

a. of 3 members, in the case of the competition for ACS, CS and CSIII;

b. of 5 members, of which at least 3 are from outside IBPC-NS, for CSII and CSI.

Article 24. The composition of the appeals resolution committee is appointed by administrative act of the IBPC-NS director and is composed of 3 members.

Article 25. The work of the competition committee and the appeals resolution committee is led by one of the two members of each committee, affiliated with IBPC-NS, as president, appointed by decision by the Director of IBPC-NS.

Article 26. The competition committee and the appeals settlement committee benefit from administrative support from IBPC-NS, provided by a secretary appointed by administrative act of the Director, who is not a member of the competition committee and does not take part in the committee's decisions.

Article 27. In well-justified situations, illness, internal/external travel (business interests), at most one member of the competition committee may participate in the online videoconference system. The recording of the meeting will be part of the competition file.

Article 28. The decisions of the competition committee and those of the appeals resolution committee are taken by open vote of the members and must meet the favorable vote of at least half plus one of the number of component members.

VII. Competition evaluation

Article 29. The competition consists of evaluating the scientific activity and research skills of the candidates for the vacant positions put up for competition, according to the evaluation criteria and its own grading scales established internally and approved by the Scientific Council of IBPC-NS (Annex SC.C and Annex GN).

Article 30. The competition for filling vacant positions of ACS and CS consists of *written, oral and/ or practical and file tests,* specific to the position and is evaluated as follows:

a. the result of the competition tests is assessed by each member of the competition committee through rating from 1.00 to 10.00;
b. the grade of each competition test represents the arithmetic average of the grades awarded by each member of the competition committee;
c. the final score represents the arithmetic average of the marks of the competition tests;
d. a candidate can only be declared the winner if he/she obtained a final score of at least 8.00 and no score below 7.00 in the competition tests;
e. The Scientific Council analyzes compliance with the procedures established by its own regulations. contest and approves the report on the contest by open roll call vote;
f. the weight of the competition tests in the final result is calculated as follows:
i) for ACS: written test (50%), oral test (50%) ii) for CS: file evaluation (33.3%), written test (33.3%), oral test (33.3%)

Article 31. The competition for filling the vacant positions of CSIII, CSII and CSI consists of *analyzing the application file for the competition* and awarding points, based on a grid adapted to the specifics of the candidate's job activity and his/her performance, and may *also include an interview test.* The evaluation process is carried out as follows:

a. after analyzing the competition file, each member of the competition committee awards a score, based on a grid adapted to the specifics of the candidate's job activity, in accordance with the thresholds established by the minimum standards and by the research organization's own standards, as appropriate;

b. the individual score awarded by a member of the competition committee represents the sum of the scores obtained by the candidate, related to each quantitative threshold in the research organization's own standards.

c. the total score represents the arithmetic average of the individual scores given by the members the commission;
d. if the competition also includes an interview test, a score is awarded that represents the arithmetic average of the scores awarded by the committee members;
e. the maximum score of the interview test cannot exceed 20% of the total calculated score;
f. the final score represents the sum of the scores awarded following the analysis of the file and the interview;
g. The Scientific Council analyzes compliance with the procedures established by its own regulations.

contest and approves the report on the contest, by open roll call vote;

h. the weight of the competition tests in the final result is calculated as follows:

i) for CSIII: file evaluation (80%) and interview test (20%);

ii) for CSI and CSII: file evaluation (100%).

Article 32. The result of the competition is analyzed and approved by the Scientific Council of IBPC-NS, the final score being calculated according to the formulas:

a. for ACS: Pfinal = (Pscris + Poral)/2; b. for CS:

Pfinal = (Pscris + Poral + Pdosar)/3;

c. for CSIII: Pfinal = Pfile × 80% + Pinterview × 20%;

d. for CSII and CSI: Pfinal = Pdosar.

Article 33. If the competition includes written, oral and/or practical tests, respectively an interview, the competition committee evaluates the candidate from the perspective of the following non-cumulative criteria:

a. the relevance of the results of the research and/or innovation activity, in relation to the topic of the position for which they are running;

b. the impact of the candidate's research and/or innovation activity and scientific results, in relation to the topic of the position for which he/she is applying, reflected in scientific publications;

c. the international scope of activities, reflected in scientific publications, patents, participation in scientific conferences, individual and institutional collaborations, projects, prestigious scholarships, the quality of visiting professor/researcher, and membership in the editorial boards of top journals in the field;

d. the ability to attract research funds or to collaborate with public and/or private research organizations and to lead research and development projects;

e. professional prestige;

f. organizational capacity;

g. ability to mentor young researchers or students;

h. the ability to transfer knowledge and results to the economic or social environment or to popularize one's own scientific results;

i. the ability to work in a team and the efficiency of his/her scientific collaborations, depending on the specifics of the candidate's field;

j. professional experience in institutions other than the institution organizing the competition.

Chapter VIII. Competition results

Article 34.

(1) Following the completion of the evaluation process, the competition committee establishes, for each position, the hierarchy of candidates and nominates the candidate who obtained the best results in relation to the final score calculated.

(2) The president of the competition committee draws up a report on the competition (Annex 3C), signed by each member of the committee and based on the evaluation reports (Annex 2C) drawn up by

each member of the competition committee and respecting the hierarchy of candidates decided by the selection committee contest.

(3) The Scientific Council, after analyzing the report and related documentation received from the president of the competition committee, verifies compliance with the procedures established by the competition regulations and approves or not the report on the competition, by open roll call vote. The Scientific Council cannot modify the hierarchy of candidates resulting from the evaluation carried out by the competition committee.
contest.

(4) After the approval of the files and the approval of the competition committee report by the Scientific Council, it is submitted to the Director of IBPC-NS.

Article 35.

(1) The competition files for obtaining the degrees of ACS, CS, CSIII, CSII and CSI are submitted by the IBPC-NS within 10 calendar days from the completion of the competition to the Biological Sciences Section, which within a maximum of 15 calendar days will analyze the file for the award of the professional degree of research and development. In case of favorable approval, it will forward the file to the Legal and Communication Service for verification.

(2) The Legal and Communication Service will approve the file regarding the legality of the competition within a maximum of 15 calendar days from the receipt of the file from the Biological Sciences Section. In case of favorable approval, it will forward the file to the Research and Doctoral Programs Service.
(3) The Research and Doctoral Programs Service will submit for approval to the Presidium of the Romanian Academy, within a maximum of 5 calendar days, the competition files that have obtained the favorable opinion of the Biological Sciences Section and the Legal and Communication Service.
(4) After the approval of the results of the promotion exam by the Presidium of the Romanian Academy, the files are returned to IBPC-NS.

Article 36.

(1) If, following the administrative analysis, it is found that the competition file is incomplete or does not comply with the legal regulations in force, as well as the provisions of the institute's own competition regulations, the competition file is returned to IBPC-NS. **(2)** Within 15 days from the date of return, IBPC-NS is obliged to update it,
so that the legal provisions are respected and to resend it to the Biological Sciences Section/Service that found the non-compliance with the legal regulations in force.

(3) If it is not possible to complete the file of the candidate declared the winner, so as to comply with the legal regulations in force, as well as the provisions of the IBPC-NS regulation, the candidate in the next place is declared the winner, and his file is sent to the Biological Sciences Section/Service that found the non-compliance with the legal regulations in force, for administrative analysis, in compliance with the provisions of paragraph (1). **(4)** If there is no longer any candidate who meets the conditions, the competition is resumed without the need for a new
approval for its organization.

Article 37.

(1) The duration and completion of the competition is 15 calendar days from the date of closing the registration for the competition, at the level of the competition committee, and 45 calendar days until the submission of the report of the competition committee and the file containing the documents related to the competition to the Presidium of the Romanian Academy.

(2) The result of the competition is posted at the IBPC-NS headquarters and on its website, within 2 working days from the end of the competition.

Article 38.

(1) Contest candidates dissatisfied with the decision may file appeals within 1 working day from the date of publication of the contest result, which will be submitted to the same e-mail address in the announcement.
(2) The secretary of the commission shall forward the appeals to the appeals resolution commission, which shall resolve them within 2 working days of their registration.
(3) The chairman of the appeals resolution committee shall draw up a report on the appeals (Annex 3C) submitted, signed by each member of the committee and based on the reports written (Annex 2C) by them.

(4) The Scientific Council, following the analysis of the report and related documentation received from the president of the appeals resolution committee, approves or denies the report on the submitted appeals, which is finally submitted to the Director of IBPC-NS.
(5) The final results of the competition are displayed and within 5 working days of the display, they must be published on the institute's website together with the CV, the verification sheet of the fulfillment of the institute's own standards and the List of scientific publications of the candidate declared admitted. **(6)** If the vacant position for which the competition is organized has not been filled, the competition
can be resumed, in compliance with the legislation in force.

Chapter IX. Recruitment

Article 39. The professional degrees of ACS, CS, CSIII, CSII and CSI of the IBPC-NS are granted by decision of the President of the Romanian Academy, following the approval of the results of the public competition by the Presidium of the Romanian Academy.

Article 40. IBPC-NS prepares a summary report (Annex 7) on the organization and conduct of the competition, which is sent annually, within 15 calendar days from the end of the calendar year for which the report is made, both in physical format with the forwarding address, to the Research and Doctoral Programs Service, and in electronic format to the email address bpg@acad.ro.

Article 41. The recruitment of RDI personnel to positions corresponding to their professional functions and grades is carried out according to the principle of professional merit, based on certain procedures.

transparent and fair procedures that respect the general principles and conditions set out in the European Charter for Researchers.

Article 42. The personal data of the persons involved in the examination process are processed within the IT platform, in compliance with the provisions of Regulation (EU) 2016/679 on the protection of natural persons with regard to the processing of personal data and on the free movement of such data, and repealing Directive 95/46/EC (General Data Protection Regulation).

Article 43. Annexes SC.C, DA, L, 1-5GN, 1A-6A, 1C-4C, 1-9, 1.1C-1.3C, 2.1C and 2.2, are part of this Regulation and together with it, have been established and drawn up by IBPC-NS in accordance with the regulations and models proposed by the Romanian Academy within the Methodological Norms regarding the organization of the competition for filling vacant positions of CDI in the institutes of the Romanian Academy/July 15, 2025. These are the only documents recommended for use in the conduct of the competition, being made available to all personnel involved in the competition procedure, through the official website of IBPC-NS and the common partition on the institution's intranet.

These regulations, in their revised form, approved at the meeting of the Scientific Council of IBPC-NS on 13.01.2026, replace the old Regulation of 6.10.2025. Furthermore, these regulations may be adjusted by the calibration provided by the competitions for each category (scientific degree) that will continue to be held.

Tissue engineering of blood vessels using three-dimensional bioprinting of endothelial and smooth muscle progenitor cells

PN-III P1-1.1-PD-2016-1660

Phase I report – 2018

Abstract

3D Bioprinting uses 3D printing techniques for making tissues and organs that mimic the natural tissue architecture. Cells, growth factors and biomaterials are associated in a "bioink" that can be printed using the 3D bioprinter to create structures in which cells grow and differentiate. Amniotic fluid stem cells are easy to obtain, have a high proliferation rate, a normal karyotype, long telomeres, do not form tumours, have immunomodulatory capacity and are multipotent. Using 3D bioprinting, the proposed model was constructed, having a uniform tubular structure, resistant to subsequent histological processes, suggesting good resistance and elasticity. The optimal parameters for printing were: 1.1 to 1.2 bar pressure, 1 mm / sec print speed using a 0.2 mm internal needle, temperature 18ºC, ultraviolet polymerization 5 seconds / layer, layers number 10, diameter of construct 2.5 mm. Using these parameters were made vascular constructs with a diameter of 2.46 mm, a wall thickness of 1.4 mm and a height of 2.79 mm. In the optical microscopy using histological staining of the vascular construct sections was observed a network formed by the collagen, hyaluronic acid and polyethylene glycol hydrogel that could permit the attachment of cells and nutrients diffusion. Biological fluids up-take and enzymatic degradation tests that vascular constructs are hydrophilic and biodegradable. Cells isolate from amniotic fluid are mesenchymal stem cells with a fibroblast-like phenotype and an increased expression of the pluripotent markers SSEA-1, SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81, and mesenchymal markers CD29, CD49e, CD56, CD73, CD90. Endothelial differentiation was performed within 4 weeks; AFSC altering its fibroblast-like phenotype in an endothelial-like phenotype, ultrastructural characterized by the presence of plasmalemmal endocytosis vesicles. Flow cytometry analysis showed the presence of endothelial cell-specific surface markers, such as CD29, CD31, CD44, CD54, and CD105. In conclusion, collagen and hyaluronic acid hydrogel allow the manufacture of vascular constructs, the parameters of the 3D bioprinter have been optimized so that the vascular model to be similar to the model designed in the BIOCAD software.

Introduction

3D Bioprinting uses 3D printing techniques for manufacture tissues, and organs that mimic the architecture of natural tissues. This technique combines cells, growth factors and biomaterials to create an environment in which cells grow and differentiate into native tissue-like structures. In 3D bioprinting, biomaterials are printed layer by layer to produce structures similar to a desired organ or tissue. The first patent for this technology was proposed in the United States in 2003 and granted in 2006 [1]. Bioprinting involves several steps including: (i) biomaterial selection, (ii) creating a bioprinting pattern using CAM software, (iii) bioprinting using dedicated bioprinters, and (iv) analysing bioprinting constructions. In 3D bioprinting an exhaustive, knowledge and methodology approach is needed using knowledge from various fields such as engineering, tissue engineering, stem cell biology and the science of biomaterials to create an ideal model. An ideal scaffold should be biocompatible, non-immunogenic, non-toxic, anti-thrombotic, with vasoactive properties, and should allow remodelling of the post-implant host tissue. To create such a scaffold, physicochemical parameters such as geometry, surface properties, pore size, adhesion, degradation and biocompatibility should be analysed [2, 3]. Although there is a wide variety of biological materials, including hydrogels, extracellular matrix, fibrillated polymers, microcarrier structures, and cell aggregates, several aspects have to be considered for obtaining structures similar to the target tissue. First of all, an important aspect is *compatibility* with the different types of printing. Extrusion printing is the most flexible method due to the mechanism and larger diameters of printheads. Drop or laser printing is only used for hydrogels. The second aspect is the *bioprintability* of scaffolds. In this case, the bioprinting of hydrogels is superior to other bioinks. The third aspect is *replicability,* the constructs should be as close as possible to the desired tissue. Scaffold degradation, cell interactions and proliferation are important for tissue formation. The fourth aspect is related to the *bioprinting resolution*, which depends on bioprinting type as well as on bioink. Laser bioprinting of hydrogels has a resolution of 5.6 ± 2.5 μm, while the drop or extrusion bioprinting between 50-100 μm. The fifth aspect is *accessibility*. Matrigel ™, fibrin and collagen hydrogels are expensive compared to synthetic polymers. In a scaffold, hundreds of millions of cells are needed so that obtaining them could be intensive, costly and time-consuming.

Other aspects involve: scalability, practicality, mechanical and structural integrity, degradability, commercial availability, immunogenicity and applicability. Despite the multitude of biomaterials that appear daily, relatively little research has been devoted to the development of biomaterials for the bioprinting process. Although a large number of hydrogels have great potential for tissue engineering, only a limited number can be used in bioprinting due to the lack of bioprintability and toxicity of degradation products and to the bioprinter parameters that should be optimized for each specific tissue. There are essential improvements in bioinks technology for bioprinting. In the near future there will be a new field such as developing and designing new materials for bioprinting. The main objectives for improving bioprinting are to minimize cell loss, promote cell-cell interactions, increase mechanical properties, and biocompatibility of 3D bioprinting scaffolds. In the future, new biological materials compatible with 3D bioprinting processes will advance research in the field of tissue engineering and regenerative medicine. Amniotic fluid cells are a heterogeneous population of mesenchymal cells of fetal origin of great importance in regenerative medicine. This population is known to have low immunogenicity, so it is less likely to generate an immune response thus having a high therapeutic potential [4, 5]. Phenotypes found in cell culture in amniotic fluid include epithelial-like and fibroblast-like cells [6]. There are also approximately 0.1-0.5% stem cells defined by c-kit expression (CD117 +) on the cell surface. The regenerative potential of amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells (AFSC) derives from their ability to differentiate and reduce immunogenicity [7]. AFSC can differentiate into different cell lines, such as endothelial [8], cardiac [9], neural, bone [10]. AFSC can also be reprogrammed without the use of gene transfer technology for induction of pluripotent stem cells [11]. The literature suggests a strong correlation between AFSC and the cardiovascular system. AFSC have demonstrated the ability to form capillary-like networks when grown in hydrogels and there is also evidence of paracrine signalling when AFSC are indirectly co-cultivated with human cardiac cells thereby modulating cardiac regeneration [13].

The project aims is to develop vascular structures using polymeric hydrogels and endothelial and muscle progenitor cells derived from AFSC using 3D bioprinting. Thus, the goal for 2018 was "Obtaining and characterizing endothelial and muscle progenitor cells and vascular model" with the following activities:

1. Determining optimal 3D printing parameters and creating vascular structure

2. Testing resorption rate of vascular structures under conditions that mimic biological fluids

3. Morphological and phenotypic characterization of differentiated muscle and endothelial progenitor cells from AFSC

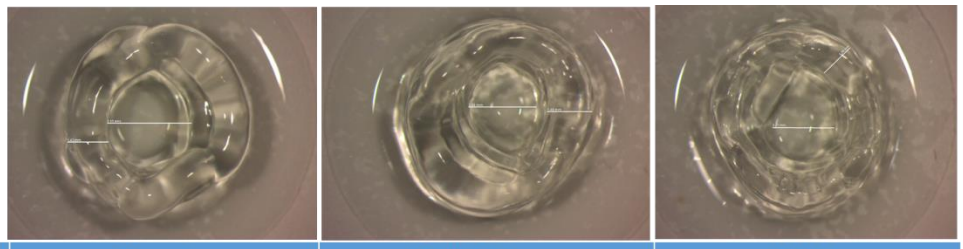
1. Determining optimal 3D printing parameters and creating vascular structure

Establishment of the vascular model was performed using the BIOCAD software. A 10-layer vascular construct having a diameter of 3 mm and a height of 2.5 mm was bioprinted. After each layer, the polymerization module was inserted. A collagen/hyaluronic acid/polyethylene glycol gel was used for printing. The hydrogel polymerization was performed by exposure to UV for 5 seconds / layer. Working pressure has been established according to the physicochemical properties of the printed hydrogel. The optimal pressure is 1.1 - 1.2 bar. Printhead speed is a very important parameter for printing, and is dependent on the physicochemical properties of the hydrogel. At a too high speed it does not close the vascular structure, and at a low speed it creates a thick layer that leads to the formation of a vascular construct over the desired size. The printing speed was set at 1 mm / sec using a needle with 0.2 mm internal diameter. For optimum printing, the hydrogel was printed at 18ºC, with the 3D Discovery bioprinter which have the possibility to adjust the printhead temperature (Figure 1).

Diameter of construct	Number of layers	Pressure	UV	Speed rate	Temperature	Needle diameter
2.5 mm	**10**	**1.1 bar**	**5 seconds**	**1mm/sec**	**18ºC**	**0.2 mm**

Figure 1. Optimal printing parameters of vascular constructs using collagen / hyaluronic acid / polyethylene glycol hydrogel

Using these parameters, vascular constructs with a diameter of 2.46 mm (± 0.41), wall thickness of 1.4 mm (± 0.10) and a height of 2.79 mm (± 0.05) (Figure 2) were bioprinted. These results show that the hydrogel can be used for vascular constructs and meet the desired requirements for reproduce with accuracy the model created in the BIOCAD.



CONSTRUCT	Diameter	Wall thickness	Height
Construct 1	2,95 mm	1,43 mm	2,73 mm
Construct 2	2,24 mm	1,49 mm	2,82 mm
Construct 3	2,21 mm	1,28 mm	2,84 mm

Figure 2. Measurements of bioprinting vascular constructs after optimization of 3D Discovery bioprinter parameters.

The morphological characterization of vascular constructs was performed by optical microscopy after histological preparation and microtome frozen sections of vascular constructs. The sections were stained by Haematoxylin & Eosin and Trichromic Masson techniques. For the microtome sections, constructs were fixed with PFA 4%, 30 minutes at room temperature, then washed with phosphate buffer and passed through 4%, 5%, 10%, 20% and 50% glycerol baths for cryoprotection. The constructs were covered with OCT and cut to the microtome at a thickness of 5µm. The sections were then stained using the classic histological staining techniques.

The results showed that the structures exhibit a tubular, uniform structure, resistant to subsequent histological procedures, which suggests good resistance and elasticity. These latter two aspects will be deepened in stage 2 of the project using rheology and elasticity techniques. Optical microscope imaging of the sections shows a relatively uniform network structure, which would allow the attachment of cells and the exchange of nutrients and gases. By histological staining of the sections, was revealed the network structure of collagen and hyaluronic acid hydrogel (Figure 3).

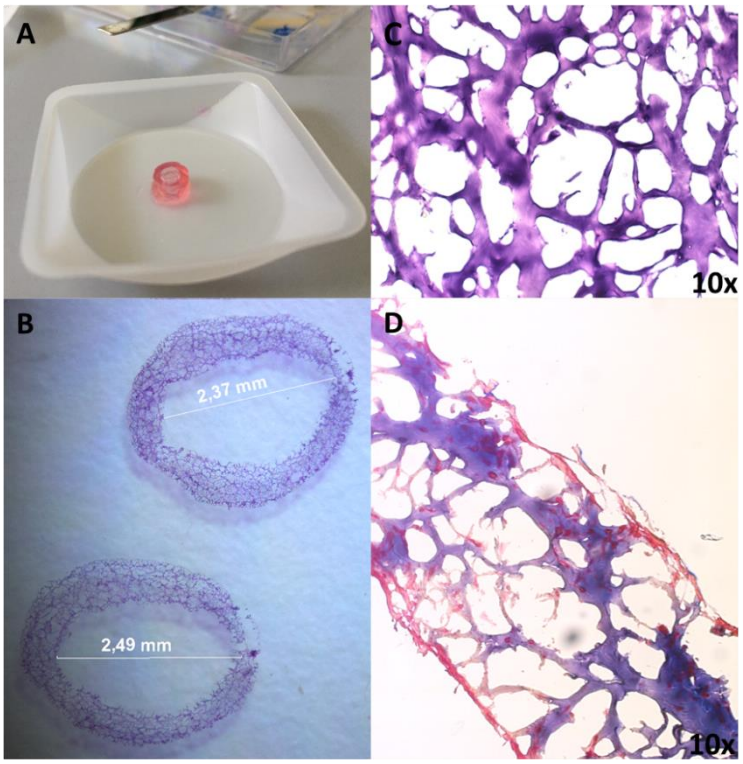


Figure 3. Macroscopic and microscopic morphology of bioprinting vascular constructs. (A) Macroscopic structure of bioprinted vascular construct; (B) Histology sections of vascular constructs; (C) H&E staining and (D) Trichromic Masson of bioprinted of vascular construct sections

2.Resorption rate test of vascular constructs under conditions that mimic biological fluids

Reabsorption experiments were performed to demonstrate the hydrogel behaviour in the presence of water and other fluids. Bioprinting constructs were weighted after printing, then immersed into PBS and weighed at 1, 2, 4, and 24 hours. The resorption rate was calculated according to the formula:

$$\text{Wateruptake} = \frac{Ww - Wd}{Wd(g/g)} \text{ x 100}$$

where: Ww = construct weight after immersion in the fluid at time t; Wd = construct weight before immersion

The results showed that the hydrogel absorbs maximum of PBS at 2 hours after immersion, having a weight gain of 22.32% against the control construct. At 4 and 24 hours the values are similar to those of 1 hour (18%), suggesting that the hydrogel is balanced with the medium within 4 hours (Figure 4).

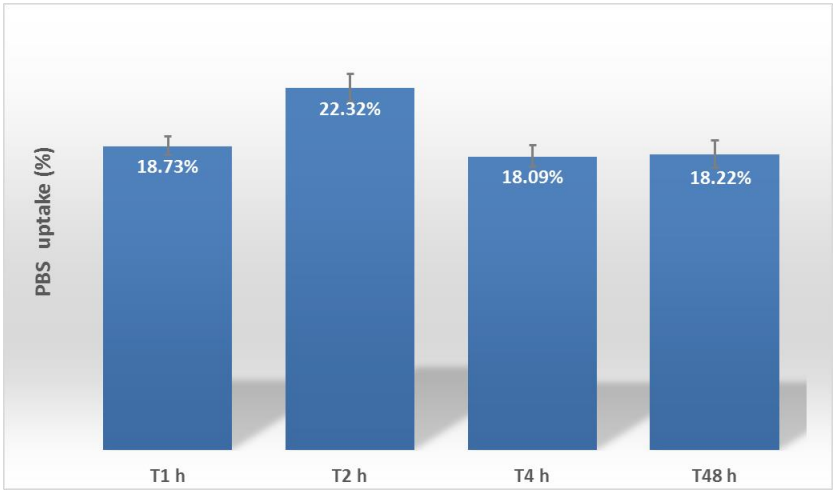


Figure 4. Hydration of bioprinted vascular constructs in saline phosphate buffer

Enzymatic degradation of the constructs was revealed using type I collagenase. Bioprinted vascular constructs were introduced into culture medium (control constructs) and in collagenase type I medium (10 μg / ml and 50 μg / ml) and then weighed at different intervals time (30, 60, and 90 minutes). Weight loss was calculated using formula:

$$\%\text{weight loss} = \frac{Wi - Wt}{Wi \times 100}$$

where: Wi = construct weight in collagenase free medium; Wt = construct weight in collagenase type I medium

The results showed a 36.4% and 47% weight loss respectively at 90 minutes after exposure to 10 μg / ml and 50 μg / ml, collagenase respectively suggesting that the hydrogel is biodegradable (Figure 5).

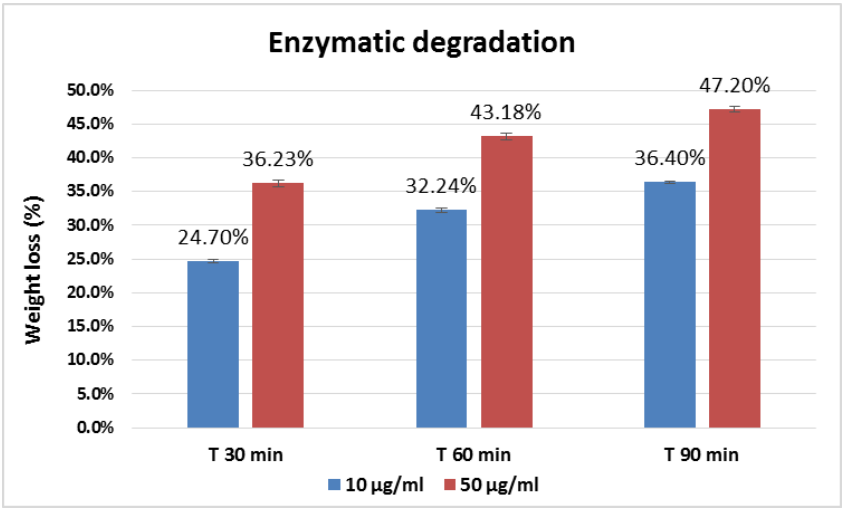


Figure 5. Weight loss of bioprinted vascular constructs as a result of enzymatic degradation using type I collagenase

3. Morphological and phenotypic characterization of differentiated muscle and endothelial progenitor cells from AFSC

Amniotic fluid contains several cell types that result from fetal and embryonic tissues, including a population of mesenchymal stem cells. The advantages of these cells are: easy to obtain (used for prenatal diagnosis, and the rest can be used for research or different clinical applications) have a high proliferation rate (population doubling time is ~ 36 hours), can differentiate into adipose, muscle, cardiac, epithelial, neurons, hepatic cells. They have long telomeres, they do not form tumours, they have immunomodulatory capacity and are multipotent. Cells were harvested by centrifugation of the amniotic fluid for 10 minutes at 400g and cultivation of the sediment in BIOAMF-2 culture medium. After 5 days, the medium was changed to remove non-adherent cells, and then the medium changed twice a week. For cell differentiation, they were grown in EGM-2 medium (Endothelial Growth Medium) supplemented with growth factors: VEGF 40 ng / ml; IGF-1 20 ng / ml; EGF 10 ng / ml; βFGF 10 ng / ml; ECGF 10 μl / ml medium. Cytokines were added every medium changes.

After 4 weeks of growing in endothelial differentiation medium, AFSC changes its morphology from a fibroblast-like phenotype to an endothelial-like phenotype. By electron microscopy, the presence of plasmalemmal vesicles was observed suggesting that they had endocytosis capacity like endothelial cells (Figure 6).

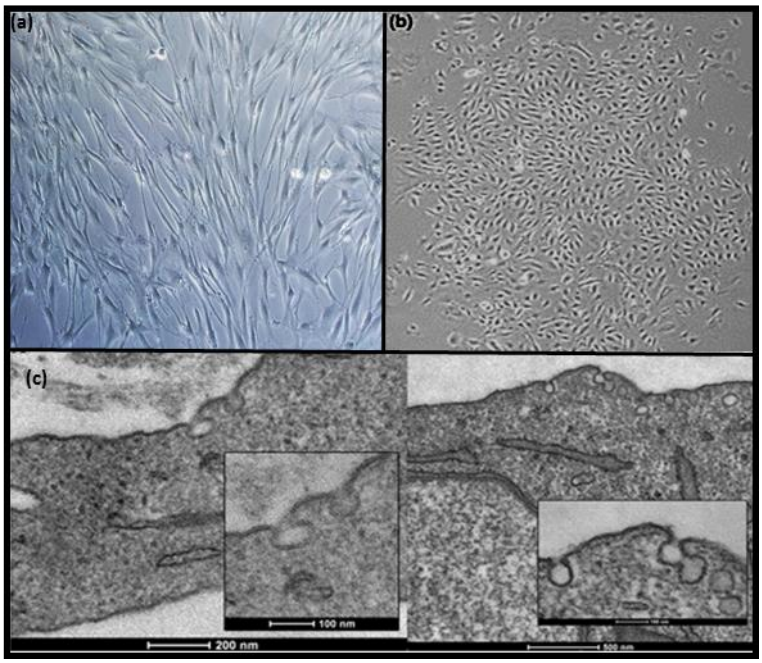


Figure 6. AFSC morphology cultured in BIOAMF medium and in EGM-2 endothelial differentiation medium supplemented with 40 ng / ml VEGF growth factors; IGF-1 20 ng / ml; EGF 10 ng / ml; βFGF 10 ng / ml, ECGF 10 µl / ml. (a) AFSC cultured in BIOAMF medium presents a fibroblast-like phenotype. (b) AFSC cultivated for 4 weeks in the EGM-2 medium shows an epithelial-like phenotype. (c) The AFSC ultrastructure cultivated in EGM-2 differentiation medium revealed the presence of plasmalemmal vesicles.

AFSC immunophenotype before and after differentiation was assessed by flow cytometry technique. Pluripotent markers (SSEA-1 SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81) and markers specific for mesenchymal and endothelial stem cells: CD29, CD31, CD44, CD49e, CD54, CD56, CD73, CD90, CD133 was used for characterisation. AFSC were trypsinized and labelled with PE or FITC-antibodies (100,000 cells / 10 µl antibody). The cells were incubated 1 hour at room temperature in the dark, then washed with PBS and centrifuged for 10 minutes at 300g to remove unbound antibodies. The cell pellet was mixed in 300 µl of PBS and analysed on the Gallios flow cytometer (Beckman Coulter).

The results showed that cells isolated from amniotic fluid are stem cells with increased expression of SSEA-1 (72.8%), SSEA-4 (85.3%), TRA1-60 (94.5%) and TRA1-81 (89.2) %) (Figure 7).

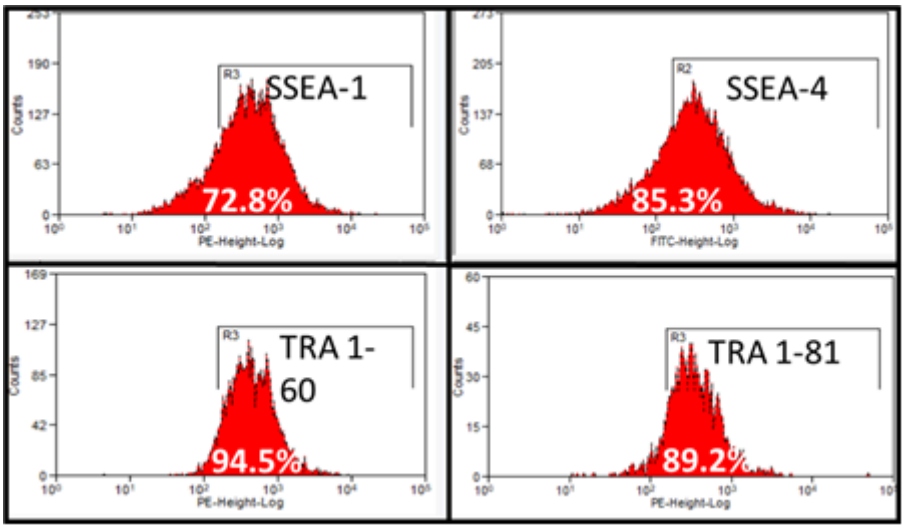


Figure 7. Stem cell-specific pluripotent markers present on the undifferentiated AFSC surface

AFSC cultured in BIOAMF medium exhibits a mesenchymal phenotype characterized by surface markers CD29 (54.8%), CD44 (22.8%), CD49e (99.8%), CD56 (75.2%), CD73 (97.5%), CD90 (98.4% (Figure 8). CD29 is β1 integrin, associates with integrin α1 and α2 forming collagen receptors. It is expressed on the surface of mesenchymal cells and generally on the surface of the adherent cells where it binds the actin cytoskeleton with the extracellular matrix and transmits two-way signals between the extracellular matrix and the cytoplasm. Homing cellular adhesion molecule (HCAM) is a surface glycoprotein involved in cell-cell interactions in cell adhesion and migration. CD44 may also function as a receptor for hyaluronic acid and may interact with other ligands such as osteopontin, collagen and matrix metalloproteinases. CD49e is α5 integrin which in combination with β1 integrin forms the fibronectin receptor. CD56 (NCAM) is part of the adhesion molecule family being neuronal cells. Data from the literature and previous results have shown that AFSC have an increased potential for differentiation in neural cells, so the medium in which they are cultivated and the duration of cell cultures is very important [13]. CD73 and CD90 are markers specific to mesenchymal adherent cells.

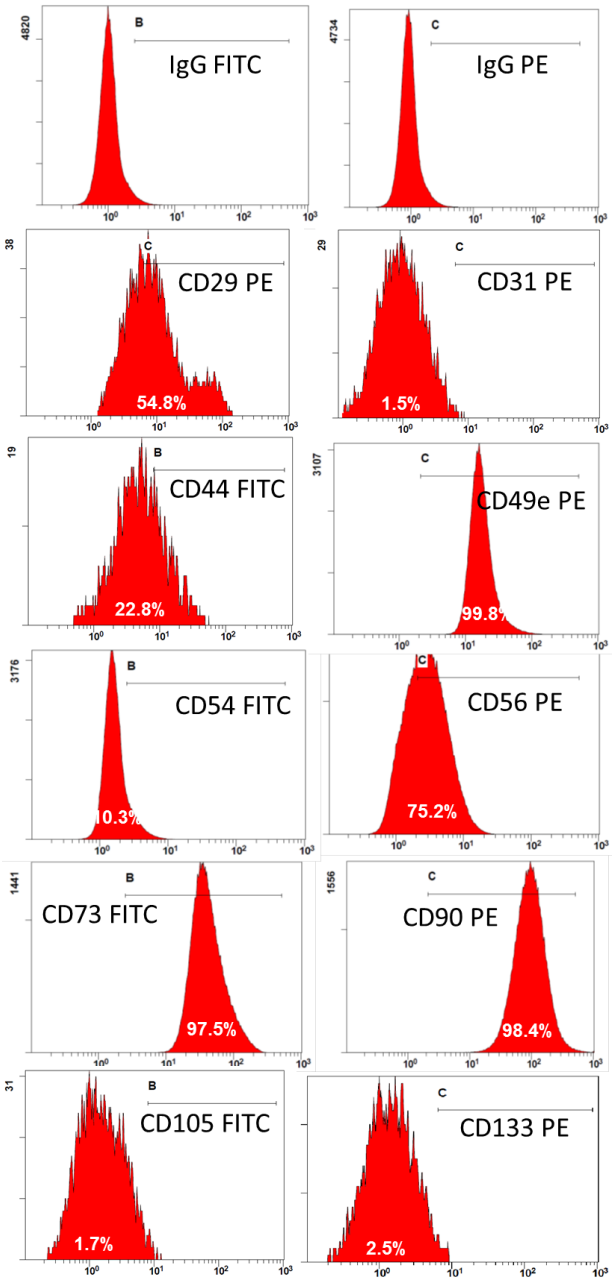


Figure 8. Immunophenotype profile of AFSC cultivated in BIOAMF medium

After growing AFSC in EGM-2 medium supplemented with 40 ng / ml VEGF growth factors, 20 ng / ml IGF-1, 10 ng / ml EGF, 10 ng / ml βFGF and 10 µl / ml ECGF for 4 weeks flow cytometry assay showed the presence of endothelial cell-specific surface markers. Expression of CD29 (98.4%) increased in EGM-2, and CD56 (12%) decreased, suggesting that cells switched neuronal differentiation to an endothelial phenotype. Endothelial cell markers present on the surface of cells were: CD31 (50.7%), CD54 (58.3%), CD105 (67.2%) (Figure 9). CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule) is a platelet and endothelial cell specific adhesion molecule

involved in angiogenesis, vasculogenesis, integrin activation and leukocyte migration. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) is an immunoglobulin family glycoprotein mediated on the surface of immune and endothelial cells, facilitating transmigration of leukocytes through vascular endothelium. CD105 (endoglin) is a protein involved in angiogenesis being found on the surface of vascular and endothelial progenitor cells.

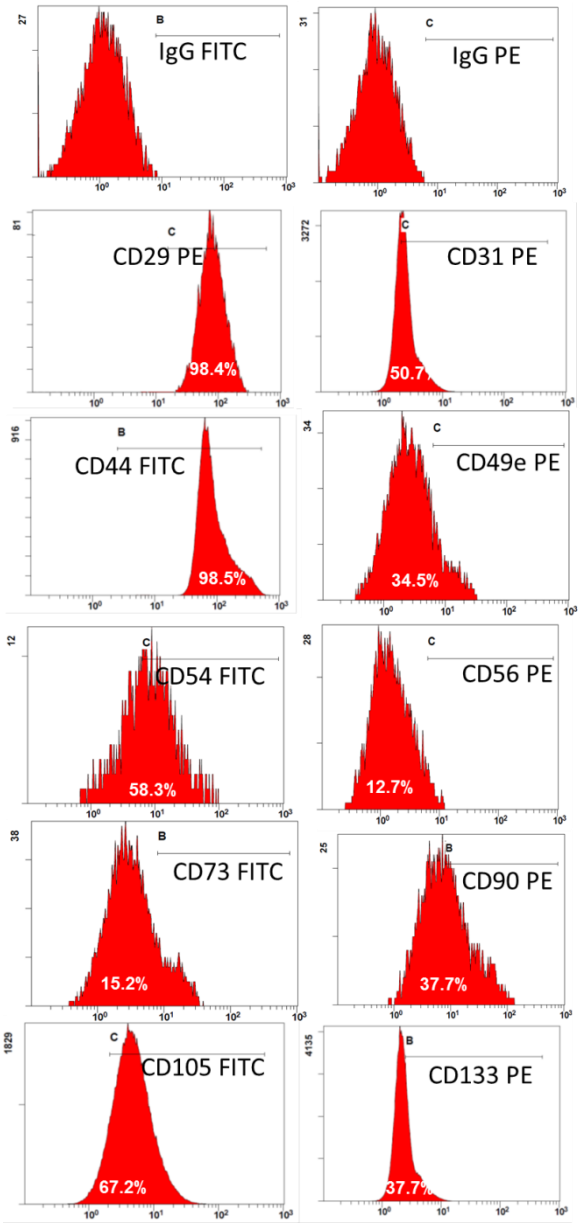


Figure 9. Immunophenotype profile of AFSC cultivated in the endothelial differentiation medium EGM-2

In conclusion, the collagen/hyaluronic acid hydrogel allows the creation of the vascular constructs; the parameters of the 3D bioprinter have been optimized so that a vascular structure similar to the model developed in the BIOCAD program can be created. Amniotic fluid isolated cells are mesenchymal stem cells with potential for differentiation to other cell lines. Following the project, the cells will be differentiated into endothelial and muscle cells and then incorporated into the hydrogel and bioprinting of the vascular structure. Furthermore the bioprinted constructs will be characterized regarding biocompatibility and interactions between cells.

References

1. Thomas J.D. Could 3D bioprinted tissues offer future hope for microtia treatment. International Journal of Surgery, 32, 43-44, 2016

2. Chua C.K., Yeong W.Y. Bioprinting: Principles and Applications. Singapore: World Scientific Publishing Co., 2015.

3. Datta P, Ayan B, Ozbolat IT. Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication. Acta Biomaterialia 51, 1–20, 2017.

4. Abdulrazzak H, De Coppi P, Guillot PV. Therapeutic potential of amniotic fluid stem cells. Curr Stem Cell Res Ther. 8(2):117-24, 2013.

5. Pozzobon M, Piccoli M, Schiavo AA, Atala A, De Coppi P. Isolation of c-Kit+ human amniotic fluid stem cells from second trimester. Methods Mol Biol. 1035:191-8, 2013.

6. Pipino C, Pierdomenico L, Di Tomo P, Di Giuseppe F, Cianci E, D'Alimonte I, Morabito C, Centurione L, Antonucci I, Mariggiò MA, Di Pietro R, Ciccarelli R, Marchisio M, Romano M, Angelucci S, Pandolfi A. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid-derived cells: a morphological and proteomic approach. Stem Cells Dev. 24(12):1415-28, 2015.

7. Cananzi M, De Coppi P. CD117+ amniotic fluid stem cells: State of the art and future perspectives. Organogenesis 8:3, 77-88, 2012.

8. Benavides OM, Quinn JP, Pok S, Petsche Connell J, Ruano R, Jacot JG. Capillary-Like Network Formation by Human Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Within Fibrin/Poly(Ethylene Glycol) Hydrogels. Tissue Eng Part A. 21(7-8):1185-94, 2014.

9. Connell JP, Ruano R, Jacot JG. Amniotic fluid-derived stem cells demonstrate limited cardiac differentiation following small molecule-based modulation of Wnt signaling pathway. Biomed Mater. 10(3):034103, 2015.

10. Resca E, Zavatti M, Maraldi T, Bertoni L, Beretti F, Guida M, La Sala GB, Guillot PV, David AL, Sebire NJ, De Pol A, De Coppi P. Enrichment in c-Kit improved differentiation potential of amniotic membrane progenitor/stem cells. Placenta. 36(1):18-26, 2015.
11. Spinelli V, Guillot V.P., De Coppi P. Induced pluripotent stem (iPS) cells from human fetal stem cells (hFSCs). Organogenesis, 9(2):101–110, 2013.
12. Mirabella T, Hartinger J, Lorandi C, Gentili C, van Griensven M, Cancedda R. Proangiogenic soluble factors from amniotic fluid stem cells mediate the recruitment of endothelial progenitors in a model of ischemic fasciocutaneous flap. Stem Cells Dev., 21(12):2179-2188, 2012.
13. Iordache F, Constantinescu A, Andrei E, Amuzescu B, Halitzchi F, Savu L, Maniu H. Electrophysiology, immunophenotype, and gene expression characterization of senescent and cryopreserved human amniotic fluid stem cells. J Physiol Sci., 66(6):463-476, 2016

27.11.2018

Project Director,
Dr. Florin Iordache

Romanian Academy

Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"

PhD THESIS

Epigenetic mechanisms involved in stem cell differentiation

Coordinator:

Acad. Maya Simionescu

PhD Student:

Florin Iordache

Bucharest

2013

Table of contents

INTRODUCTION

PART I. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

CHAPTER I.1 Endothelial progenitor cells.....6
I.1.1 Definition and characteristics of stem cells.....6
I.1.2 Classification and types of stem cells.....8
I.1.3 Umbilical cord blood derived endothelial progenitor cells.....18
I.1.4 Clinical applications of endothelial progenitor cells in cardiovascular pathology.....22

CHAPTER I.2 Epigenetic mechanisms and their role in stem cell differentiation.....26
I.2.1 Definition and characteristics of epigenetic modifications 31
I.2.2 Classification and types of epigenetic modifications 32
I.2.2.1 DNA methylation.....32
I.2.2.2 Histone modifications.....34
a. Methylation
b. Acetylation
c. Phosphorylation
d. Sumoilation
e. Ubiquitinilation
f. Proline isomerization
g. ADP-ribosylation
h. Deimination
I.2.2.3 microARN.....47

CHAPTER I.3 Histone acetylation mechanisms and their role in stem cell differentiation.....57
I.3.1 Definition and characteristics of acetylation.....57
I.3.2 Classification of enzymes involved in the acetylation:.....59
I.3.2.1 Histon-acetyltransferase (HAT) 60
I.3.2.2 Histon-deacetylase (HDAC).....65
I.3.3 Mechanisms of action in acetylation of non-histone and histone protein.....72
I.3.4 The role of histone acetylation in stem cells differentiation.....78

PART II. ORIGINAL CONTRIBUTIONS.....84
II.1 Aim and Objectives.....84
II.2 Materials and Methods.....86
II.3 Results and Discussion.....106
II.3.1 Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from umbilical cord blood.....106
II.3.2 Investigation of histone acetylation levels in endothelial progenitor cells.....119
II.3.3 Effect of histone acetylation in differentiation of endothelial progenitor cells.....125
II.3.4 Analysis of acetylation of some transcription factors involved in cardiovascular morphogenesis.....129
II.3.5 The role of acetylation in „*in vitro*" neovascularization 131
II. 4. General conclusions.....145
References.....148
Dissemination of results obtained during PhD.....172
Research funding.....178

Keywords

Acetylation
Histone
Chromatine
Epigenetics
Stem cells
Endothelial progenitor cells
Fetal stem cells
Differentiation
Neovascularization
Cardiovascular diseases

Thesis abstract

Importance of the study

Understanding the mechanisms which lead to differentiation of stem cells is the primary focus of numerous studies. Accessibility of DNA to transcription factors depends on chromatin structure and its degree of compaction. Recent analysis of epigenetic changes in human and murine stem cells have provided new data on the properties of pluripotency of stem cells and their differentiation capacity. These mechanisms lead to a hierarchy of transcription, are mediated by transcription factors and are designed to control gene expression without altering the DNA. Multipotent stem cell capacity decreases with time due to repression of certain genes that presents an epigenetic "signature". Active genes in the stem cells are silent gradually with the passing of their progenitors, and another subset of tissue - specific genes are activated. This progression is achieved by selective expression of transcription factors that recognize and interact with various epigenetic changes in the chromatin. As a result of these events, chromatin becomes accessible for transcription in certain regions, allowing the necessary spatial and temporal control for stem cell differentiation. For example, protein HP1 (heterochromatin protein 1) distribution changes from a dispersed localization in embryonic stem cells to build more concentrated in distinct loci during cell differentiation. Histone acetylation was seen as a phenomenon correlated with an open chromatin conformation that allowed the expression of different genes involved in differentiation. Currently it has been observed that in acetylated state, many genes are repressed and thus differentiation to a specific cell line is blocked, maintaining the pluripotent state. Handling histone deacetylase activity could be a useful tool to generate specific cell populations in order to use them in transplantation. Discovering patterns of acetylation ("acetylation signature") involved in the differentiation of stem cells to different cell types, opening new opportunities at the interface between chemistry and stem cell biology, and can provide valuable information to improve applications of stem cells in tissue engineering and regenerative medicine.

In this context, **the aim of the thesis** is to investigate the role of histone acetylation in the differentiation of endothelial progenitor cells by analyzing the expression of different genetic markers and transcription factors that regulate the activity of these genes. Also, these studies investigate the effect of endothelial progenitor cells acetylation on the process of *„in vitro”* neovascularization.

The thesis is divided into two main parts: Part I - Current state of knowledge and Part II - Original contributions.

The first part presents the current state of knowledge and is organized into three sections.

Subchapter I present notions about the characteristics and properties of stem cells. In this chapter is presented the cell model used in the thesis, represented by endothelial progenitor cells and their potential clinical applications.

Subchapter II makes an overview of the main epigenetic modifications. It describes the mechanisms of action of these modifications and the enzymes involved in their implementation. Also in this section describes the role of epigenetic changes in stem cell differentiation to various cell lines.

Subchapter III describes the mechanisms of histone acetylation and their role in stem cell differentiation. This chapter presents the main classes of histone acetyltransferase and histone deacetylases, histone acetylation mechanisms of action and influenceof acetylation in endothelial progenitor cell differentiation.

In Part II - "Original Contributions" are presented the results of experiments aimed to investigating the role of histone acetylation in the differentiation of endothelial progenitor cells and in neovascularization *in vitro*.

Chapter II.2 - " Materials and Methods " describes the main materials and techniques used in the experiments, including many molecular and cell biology techniques: Real -Time PCR, Western blot, flow cytometry, transmission electron microscopy and scanning electron microscopy, immunocytochemistry and immunohistochemistry, colorimetric and fluorimetric methods.

Chapter II.3 - " Results and discussion " presents the main original results obtained in the studies.

Results and discussion

Understanding the mechanisms which lead to the differentiation of stem cells is the primary focus of numerous studies. Recent analysis of epigenetic changes in human and murine stem cells have provided new data on the properties of pluripotecy of stem cells and their differentiation capacity. These mechanisms lead to a hierarchy of transcription, are mediated by transcription factors and are designed to control gene expression without altering the DNA. Histone acetylation was seen as a phenomenon correlated with an open chromatin conformation, allowing the expression of various genes involved in differentiation.

Currently it has been observed that in acetylated state, many genes are repressed and thus differentiation to a specific cell line is blocked, maintaining the pluripotent state.

In this thesis we have shown that umbilical cord blood contains a rich population of endothelial progenitor cells with an characteristic immunophenotype profile: CD31, CD34, CD133, CD144, CD146, VEGFR2. Molecular analysis of cells obtained from umbilical cord blood showed the presence of genes that are involved in cardiovascular morphogenesis, such as genes for transcription factors GATA2, GATA3, GATA4, and genes that are characteristic of endothelial cells: CD31, VE- cadherin, VEGFR1, VEGFR2, vWF, CXCR4, Tie -2. We have also shown that endothelial progenitor cells have a high capacity of proliferation and migration in comparison with other fetal stem cells types. These cells can uptake acetylated LDL, and *Ulex europaeus* lectin, can form vascular network, suggesting their potential in angiogenesis and vascular repair. This was confirmed using murine embryonic ventricular sections viable or subjected to ischemia, in which we showed that endothelial progenitor cells have the ability to integrate and form vascular networks. Our results indicated that endothelial progenitor cells forming the vascular structures only on viable murine embryonic ventricular sections, while in the ischemic sections only integrate, which demonstrates a direct cell-to cell communication.

The results showed that histone acetylation inhibit the differentiation of endothelial progenitor cells. Inhibitors of deacetylation (VPA, TSA, BuA) mentain chromatin in an acetylated state corresponding to a decondensate conformation. Histone deacetylases level was significantly decreased in the presence of these inhibitors and histone H3 acetylated level was increased and these changes are correlated with the expression of differentiation markers involved in endothelial progenitor cells commitment. The molecular biology and immunophenotyping data showes that HDAC inhibitors have inhibited the expression of vWF, VEGFR2 , eNOS , CD117 , CD133 , CD144 , CXCR4 and Tie- 2, while the expression of CD34 and CD45 remains unchanged showing that the histone deacetylases are involved in the differentiation of endothelial progenitor cells. VE-cadherin expression was significantly inhibited both at the mRNA and protein level. The mechanism underlying the expression of VE-cadherin may be explained by inability of HoxC6 transcription factor to interact with acetylated histones in order to activate the VE-cadherin promoter. Gene expression of CXCR4, Tie-2 and VEGFR2 significantly decreased after treatment with TSA, the mechanism involved is controlled by Hox transcription factors whose expression is modulated in the presence of these inhibitors. Our results have shown that in the acetylated state HoxD9 expression in endothelial progenitor cells is increased in both gene and protein level.

The process of neovascularization is a complex process involving a series of interconnected steps leading to the formation of new blood vessels when vascular lesions occur in adult bodies. In contrast to angiogenesis, which is the formation of new blood vessels from some pre-existing one, neovascularization takes place via endothelial progenitor cells. These cells are mobilized to migrate, proliferate and differentiate at the target site, under the action of cytokines and the microenvironment. Our results have shown that histone acetylation inhibits neovascularization *in vitro*, acting in the processes of proliferation, adherence, migration and differentiation of endothelial progenitor cells. Endothelial progenitor cells showed a significantly decreased level of telomerase activity in comparison with the control, suggesting a decrease in cell proliferation.

Cell motility assessed using the "*wound-healing assay*" and cell impedance measurement, showed that HDAC inhibitors decrease cell motility at 24 hours after stimulation. In contrast, chemotaxis of endothelial progenitor cells was increased after treatment with HDAC inhibitors, which can be explained by the maintenance of a circulating progenitor phenotype. In the presence of 3 mM VPA our data showed a significant stimulation of chemotaxis of endothelial progenitor cells to angiopoietin, VEGF and SDF. After proliferation, mobilization, migration and adherence of endothelial progenitor cells to the target situs, the last step consists in organizing their vascular network. We analysed also this step in terms of acetylation. Growing on Matrigel in the presence of HDAC inhibitors endothelial progenitor cells can not form vascular networks. To confirm these results we used other collagen-based matrix. The results indicated that endothelial progenitor cells isolated from umbilical cord blood were able to survive and adhere to the collagen matrix. Moreover, these cells emit extensions, interact with each other and with the matrix, forming in the network structure. In acetylated state, endothelial progenitor cells lose this ability, which demonstrates that acetylation inhibits neovascularization potential of endothelial cells *in vitro*.

Handling histone deacetylase activity could be a useful tool to generate specific cell populations for transplantation . Discovering patterns of acetylation ("acetylation signature") involved in the differentiation of stem cells to different cell types, opening new opportunities at the interface between chemistry and stem cell biology, and can provide valuable information to improve applications of stem cells in tissue engineering and regenerative medicine.

Number of figures in the first part -32

Number of figures in the original contribution (Part II) – 40

Bibliographical notes – 251

Papers published in international journal (ISI) – 4

Papers published in national journals (CNCSIS B +) – 1

Oral communications: 2

Abstracts of papers presented at international scientific meetings – 11

Abstracts of papers presented at national conferences – 25

Participation in research projects - 2 national, 1 international

ROMANIAN ACADEMY

Institute of Cellular Biology and Pathology

"Nicolae Simionescu", Bucharest

THESIS

Study of progenitor cells differentiation into cardiomyocytes in order to improve cardiac cellular transplant

Coordinator
Acad. Maya Simionescu

PhD Student
Ana-Maria Rosca

2012

CUPRINS

I. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

I.1. Effect of ischemia on cardiac muscle cells

I.1.1. Structural organization of the cariomyocyte

I.1.2. The metabolism of the cardiomyocyte

I.1.3. Myocardial ischemia

I.1.4. Pathological process of the ischemic cardiomyopathy

I.1.5. Cardiomyocytes apoptosis

I.1.5.1. Extrinsic pathway of apoptosis initiation in cardiomyocytes

I.1.5.2. Intrinsic pathway of apoptosis initiation in cardiomyocytes

I.1.5.3. Rolul proteinelor din familia Bcl-2 in reglarea apoptozei cardiomiocitelor

I.2. Mesenchymal stem cells from bone marrow

I.2.1. Bone marrow structure

I.2.2. Mesenchymal stem cells

I.2.2.1. Osteogenic potential

I.2.2.2. Adipogenic potential

I.2.2.3. Condrogenic potential

I.2.2.4. The niche of mesenchymal stem cells

I.2.2.4.1. Cellular components

I.2.2.4.2. Soluble components

I.2.2.4.3. Extracellular matrix components

I.2.2.5. The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell support

I.2.2.6. Migration of mesenchymal stem cells and tissue repair

I.3. Mechanisms by which mesenchymal stem cells help repairing the heart

I.3.1. Differentiation of mesenchymal stem cells after transplantation in the infarcted myocardium

I.3.2. Paracrine action of factors released by mesenchymal stem cells in infarcted myocardium

I.4. Stem cells for cardiac repair

I.4.1. Mesenchymal stem cells

I.4.2. Skeletal myoblasts

I.4.3. Bone marrow progenitor cells

I.4.4. Embryonic stem cells

I.4.5. Induced pluripotent stem cells (iPS)

I.4.6. Cardiac stem cells

I.4.7. Clinical studies

II ORIGINAL CONTRIBUTIONS

II.1. Molecular alterations that induce cardiomyocyte apoptosis in ischemia-reperfusion

II.1.1. Introduction and objectives

II.1.2. Materials and methods

II.1.3. Results

II.1.3.1. Characterization of neonatal cardiomyocytes

II.1.3.2. Cardiomyocyte apoptosis in ischemia

II.1.3.3. Molecular changes of Bcl-2 protein induced by ischemia-reperfusion
II.1.3.4. Effect of exogenous oxidants on cardiomyocyte apoptosis
II.1.3.5. Bcl-2 protein changes induced by exogenous oxidants in CMC
II.1.4. Conclusions and discussion

II.2. Alternative methods for the isolation of mesenchymal stem cells

II.2.1. Stem cells purification (on Percoll gradient)

II.2.1.1. Introduction and objectives
II.2.1.1. Materials and methods
II.2.1.3. Results
II.2.1.3.1. Locating and quantifying c-kit and Sca-1 positive cells from mouse bone marrow
II.2.1.3.2. Separation of bone marrow cells on Percoll gradient
II.2.1.3.3. Quantification of progenitor cells in fractions obtained after centrifugation of bone marrow aspirate on discontinuous Percoll gradient
II.2.1.3.4. Evaluating the clonogen potential of haematopoietic progenitor cells
II.2.1.3.5. Expression of differentiated cell markers in fractions obtained after centrifugation of bone marrow aspirate on Percoll gradient
II.2.1.4. Conclusions and discussion

II.2.2. Isolation of mesenchymal stem cells from bone marrow

II.2.2.1. Introduction and objectives
II.2.2.2. Materials and methods
II.2.2.3. Results and discussion
II.2.2.3.1. Phenotypic characterization of cells
II.2.2.3.2. Functional characterization of mesenchymal stem cells
II.2.2.4. Concluzii

II.3. Differentiation of mesenchymal stem cell into cardiomyocytes

II.3.1. In vitro differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes

II.3.1.1. Introduction and Objectives
II.3.1.2. Materials and methods
II.3.1.3. Results
II.3.1.3.1. Characterization of stem cells
II.3.1.3.2. Effect of 5-azacytidine on the multipotentency of mesenchymal stem cells
II.3.1.3.3. Capacitatea 5-azacitidinei de a induce diferentierea miogena in celulele stem mezenchimale
II.3.1.4. Concluzii

II.3.2. Influence of factors secreted by myocardium on mesenchymal stromal cell differentiation into cardiomyocytes

II.3.2.1. Introduction and Objectives
II.3.2.2. Materials and methods
II.3.2.3. Results
II.3.2.3.1. The differentiation capacity of bone marrow stromal cells
II.3.2.3.2. Cell marking techniques

II.3.2.3.3. Marrow stromal cell differentiation induced by coculture with cardiac muscle cells
II.3.2.3.4. Marrow stromal cell differentiation induced by coculture with fetal myocardium
II.3.2.4. Conclusions

II.4. Highlighting the factors with paracrine effect secreted by mesenchymal stem cells in normal and hypoxic conditions

II.4.1. Introduction and objectives
II.4.2. Materials and methods
II.4.2. Results and discussion
II.4.2.1. Conditions of inducing apoptosis in cardiac muscle cells
II.4.2.2. Resistance of mesenchymal stem cells to ischemia induced apoptosis
II.4.2.3. Antiapoptotic effect of factors released by mesenchymal stem cells on cardiomyocytes
II.4.2.4. Identification of cardioprotective factors released by mesenchymal stem cells cultured in normal and hypoxic conditions
II.4.4. Conclusions

III. Thesis Summary and general conclusions
IV. Bibliography
Papers published during the PhD program
Research funding

KEYWORDS

Cardiomyocytes

Apoptosis

Ischaemia/Reperfusion

Exogen oxidants

Mesenchymal stem cells

Adipogenic differentiation

Osteogenic differentiation

Chondrogenic differentiation

Myogenic differentiation

Hypoxia

Percoll gradient

Cardioprotective effect

Conditioned medium

microRNA

SUMMARY

Introduction

Ischaemic and non ischaemic myopathies have as a primary consequence the dysfunction of the left ventricle, which finally leads to heart failure. This impairment of heart function decreases the quality of life, life expectancy and increases medical costs. Thus, it represents one of the major health issues all over the world (McMurray and Pfeffer, 2005). Current therapies improve in some extent the survival of the patients and relieve the symptoms, but until now, an efficient method of reversing the damaged condition of the myocardium to a normal state has not been found (Kuraitis *et al.*, 2011). The recent development of stem cell research could provide an efficient treatment of heart failure, by replacing damaged tissue with healthy and functional myocardium, which would increase the quality of life and survival of patients with various cardiomyopathies.

Mesenchymal stem cells (MSC) isolated from adult bone marrow have been intensively investigated due to their regenerative and immunomodulatory properties. Various studies on animal models showed that the transplantation of MSC in an infracted aria of the myocardium improves the cardiac function by decreasing the apoptotic process and by releasing angiogenic factors (Tang *et al.*, 2005). Nevertheless, the efficiency of differentiation into cardiomyocytes (CMC) is extremely low and it cannot explain the transitory beneficial effect observed in preclinical and clinical studies of MSC transplantation in an infracted myocardium (Rose *et al.*, 2008). Therefore, this effect was attributed to the paracrine action of MSC (Gnecchi *et al.*, 2008). These cells are able to release into the extracellular environment soluble factors (citokines, chemokines and growth factors) which have a protective effect on the injured cells of the ischemic myocardium. Moreover, recently it has been shown that MSC are able to communicate with neighbouring cells through circular membrane fragments called microvezicles. In this way, MSC can secrete various soluble components such as receptors, growth factors, biologically active lipids and nucleic acids (mRNA and microRNA) which are protected against aggressive extracellular environment (Morel *et al.*, 2004; Gatti *et al.*, 2011).

MSC are considered to be used in regenerative medicine because they have several advantages, such as:

(i) these cells can be easily isolated and propagated in culture in order to obtain a high amount of cells, needed in cellular therapy;

(ii) they have low immunogenicicy, which makes them suitable for allogeneic transplant (Dai *et al.*, 2005);

(iii) ethical issues adjacent to other types of stem cells such as embryonic stem cells are avoided.

In this general context, the aim of this thesis was to study the differentiation of progenitor cells, such as MSC isolated from adult bone marrow, into cardiac muscle cells, in order to improve the efficiency of cellular therapy of myocardial infarction. Thus, over the entire period of the doctoral stage, the studies have been focused on understanding the mechanisms by which the heart muscle is damaged during and after myocardial infarction and finding an efficient method of tissue repair. This thesis is composed of two main sections. The first part, structured in four chapters, describes the current status of scientific knowledge on the subject of this thesis, while the second part contains the original contributions of the PhD student.

I. Molecular alterations leading to cardiomyocytes apoptosis in ischaemia-reperfusion

In the first chapter of the original contributions section, the focus of the study was on answering the question whether the ischemia or reperfusion is responsible for inducing the apoptotic process in CMC. Knowing the main stimulus responsible for inducing apoptosis in ischemic myocardium is necessary in order to achieve a therapy able to slow down the progression of heart failure due to loss of contractile tissue. Thus, this study aimed to determine the individual contribution of ischemia, reperfusion and exogenous oxidants to the induction of CMC apoptosis.

The results showed that, reperfusion, rather than ischemia *per se*, was the main inductor of apoptosis in CMC. Exogenous oxidants, brought by reperfusion from the surrounding medium, are responsible for triggering the cell death process. 25-hydroxicholesterol, a component of oxidized LDL, promoted CMC apoptosis by a caspase-3 dependent mechanism. This implied the increased expression of the pro-apoptotic protein Bax, which was regulated at transcriptional level and the post-translational degradation of the anti-apoptotic protein Bcl-2 (Figure 2). The impairment of the pro-and anti-apoptotic protein ratio created favourable conditions for the initiation of the apoptotic process, which could only occur during reperfusion, when the ATP and glucose reserves were restored. The data obtained by performing this study indicated that an antioxidant therapy could play an important role in preventing the loss of viable myocardium through programmed cell death of CMC.

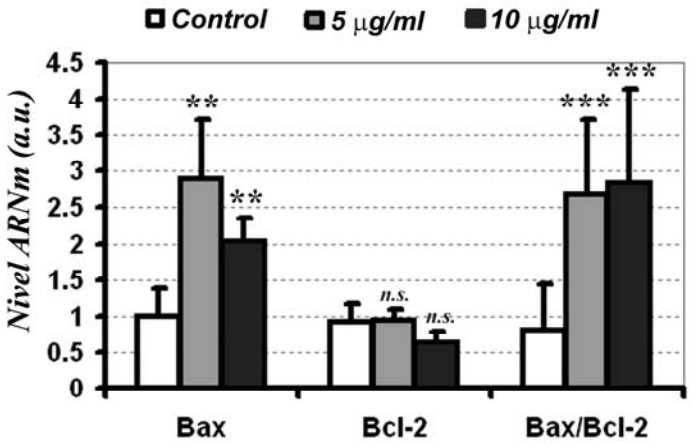


Figure 1: Quantitative RT-PCR illustrating the modification of bax and bcl-2 gene expressions and bax/bcl-2 ratio in CMC after 72 hours of treatment with 25-hydroxicholesterol.

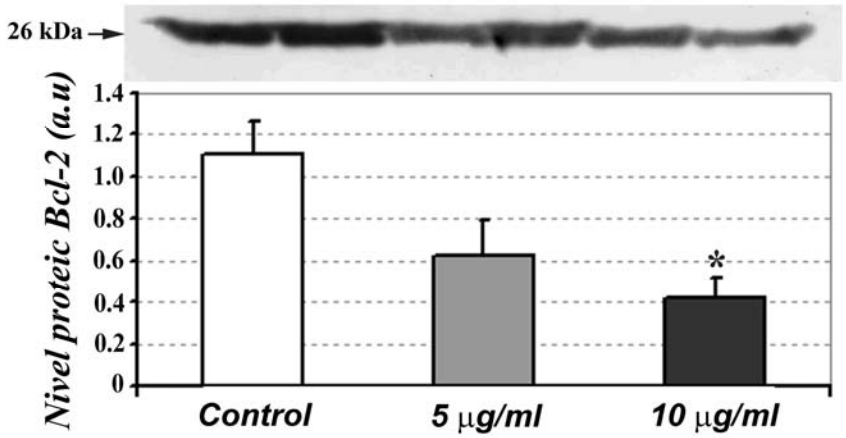


Figure 2: Quantification of the Bcl-2 protein level assessed by Western Blot after 72 hours of treatment with 25-hydroxicholesterol.

II. Isolation of mesenchymal stem cells

An important step of the doctoral stage was the development of a reliable method of isolation mesenchymal stem cells (MSC) for further use in *in vitro* differentiation studies. This presented a special interest because mouse MSC are more difficult to isolate and propagate *in vitro* than human or rat cells, because of the extensive contamination of the adherent culture with cells of haematopoietic origin. For this reason, obtaining a pure mouse MSC culture represented a challenge which resulted in the simultaneously isolation of such cells by two methods. The

homogenous MSC culture was consequently characterized as suggested by the International Society for Cellular Transplant.

II.1. Isolation of stem cells by centrifugation on a discontinuous Percoll gradient

Centrifugation of cells on a discontinuous Percoll gradient (ranging from 1.050 to 1.083 g/cm3) resulted in the recovery of six cell fractions (I–VI), corresponding to the six densities of the gradient: 1.050, 1.057, 1.067, 1.070, 1.076 and 1.083 g/ml (figure 3). Progenitor cells, characterized by the expression of Sca-1 and c-kit markers were found in fractions III-V.

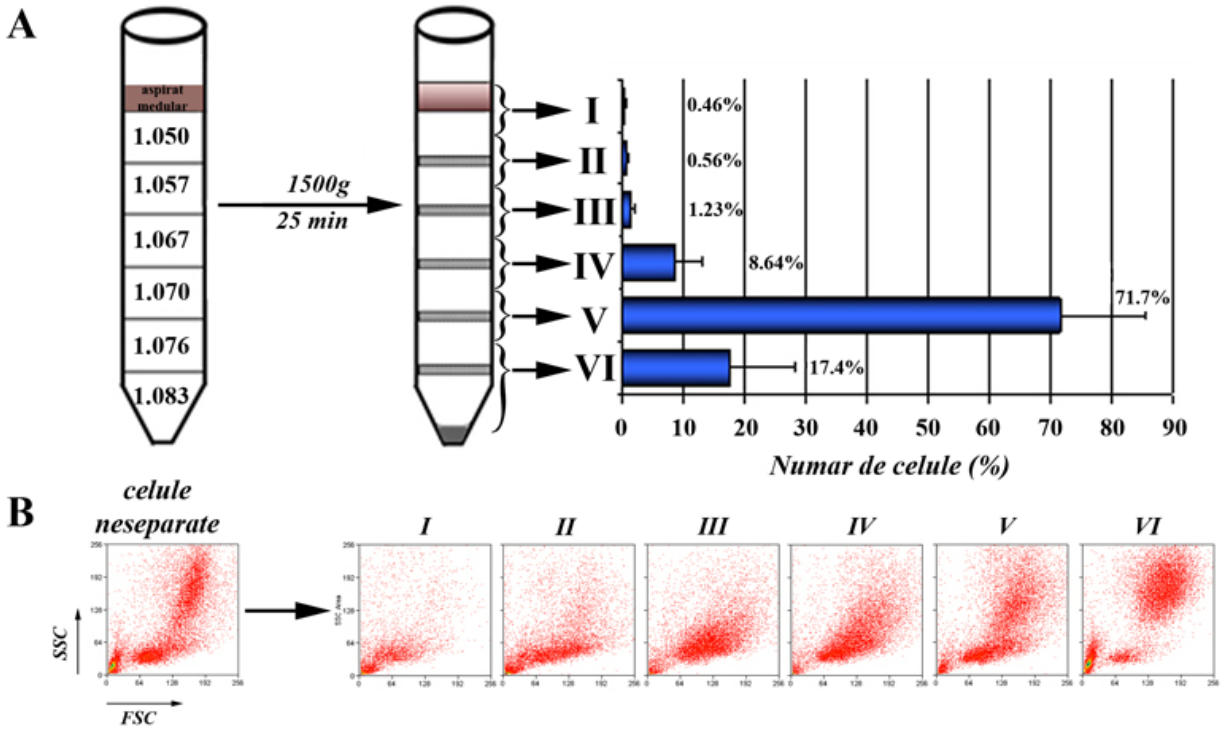


Figure 3: Bone marrow cells separation by centrifugation of Percoll discontinuous gradient. (A) Schematic illustration of the discontinuous Percoll gradient used for fractionation and the percentage of cells segregated in each fraction after centrifugation. (B) Dot-plot histograms resulting from FACS analysis illustrating the heterogeneity of cells before separation and the morphology of cells in each fraction.

The cells in fraction IV, even though they were still heterogeneous, contained a superior amount of haematopoietic progenitors, namely 45% of the population ($2x10^6$ progenitor cells from a total of $4.3x10^6$ cells, figure 4). In addition to c-kit and Sca-1 positive cells, this fraction included endothelial cells, which could play an important role in restoring function of the injured myocardium, by contributing to tissue revascularization by angiogenesis. In culture, this fraction

generated CD45^{-}/c-kit^{-}/Sca-1^{+}/PECAM^{-}/VEGFR2^{-}/osteocalcin^{-}/colagen II^{-} cells. By incubating these cells in specific differentiation media, adipocytes and osteoblasts were obtained, demonstrating their multipotent capacity (figures 5 and 6).

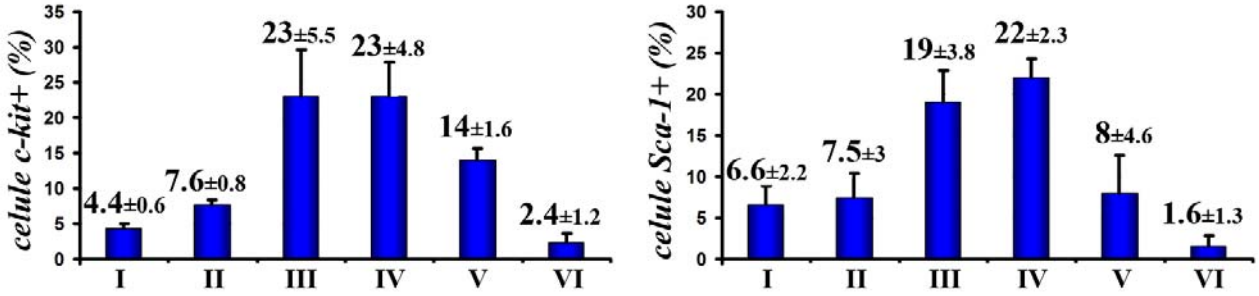


Figure 4: Overall representation of flow cytometry data showing the average percentages of c-kit+ and Sca-1+ cells within each fraction obtained after Percoll gradient separation of bone marrow aspirate.

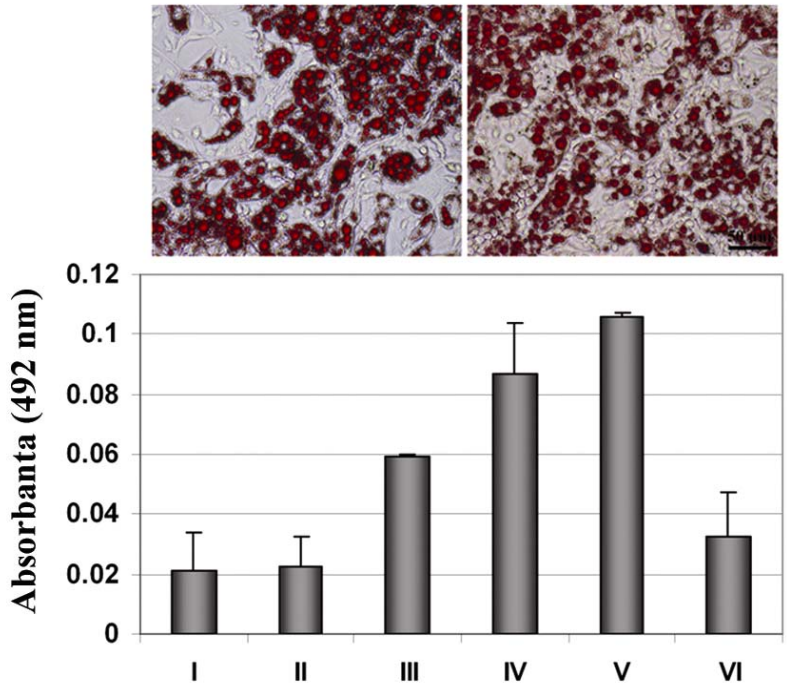


Figure 5: Spectrophotometric quantification of lipid accumulation in the six fractions after culturing the cells in adipogenic medium. The upper panel depicts a representative picture of Oil Red staining in fractions III and IV. Fraction V, despite the massive lipids accumulation, is not enriched in progenitor cells; the staining is most likely due to the presence of preadipocytes.

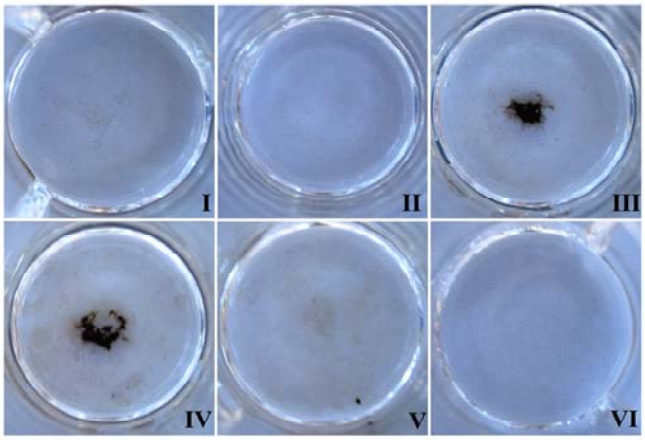


Figure 6: Light microscopy of von Kossa staining in the six fractions after cultivation in osteogenic medium. It can be noticed that fractions III and IV, but not fraction V (that contained the majority of the cells), were able to generate osteoblasts in appropriate conditions.

II.2. Isolation of mesenchymal stem cells form haematogenous bone marrow

In parallel with the method described above, a homogenous population of mouse MSC was obtained by maintaining the cells in culture for a long period of time. After approximately eight weeks, the cells a homogeneous culture with fibroblast-like appearance and highly proliferative. RT-PCR (Figure 7a) showed the presence of expression of Sca-1 and CD105 (endoglin) stem cell markers and the lack of c-kit marker, which suggested the depletion of haematopoietic progenitor cells. Another characteristic of these cells was the presence of vimentin and nestin intermediate filaments. Knowing that the presence of nestin filaments is specific to early progenitor cells with migratory capacity, the expression of nestin, associated with vimentin expression (Figure 7b) suggested for these cells a possible role in tissue regeneration.

Characterization of these cells was complemented by studies of differentiation into multiple cell types, such as adipocytes, osteoblasts and chondrocytes (Figure 8). These experiments showed their multipotent character, which was unaltered over several passages. This culture was subsequently used in studies of differentiation towards muscle cells. The data were presented in Chapter III of the thesis.

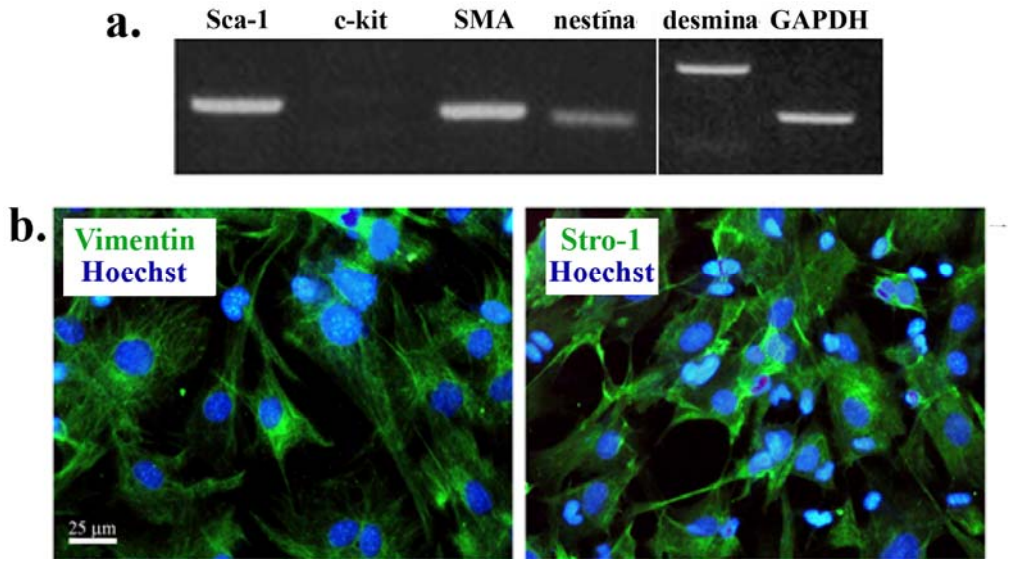


Figure 3. (a) RT-PCR showing the presence of Sca-1, smooth muscle actin (SMA), nestin, and desmin, and the lack of the hematopoietic stem cells marker c-kit; (b) Imunocitochemistry depicting the presence of the intermediary filament vimentin and of the stromal cells marker Stro-1 in all cells in the culture of MSC.

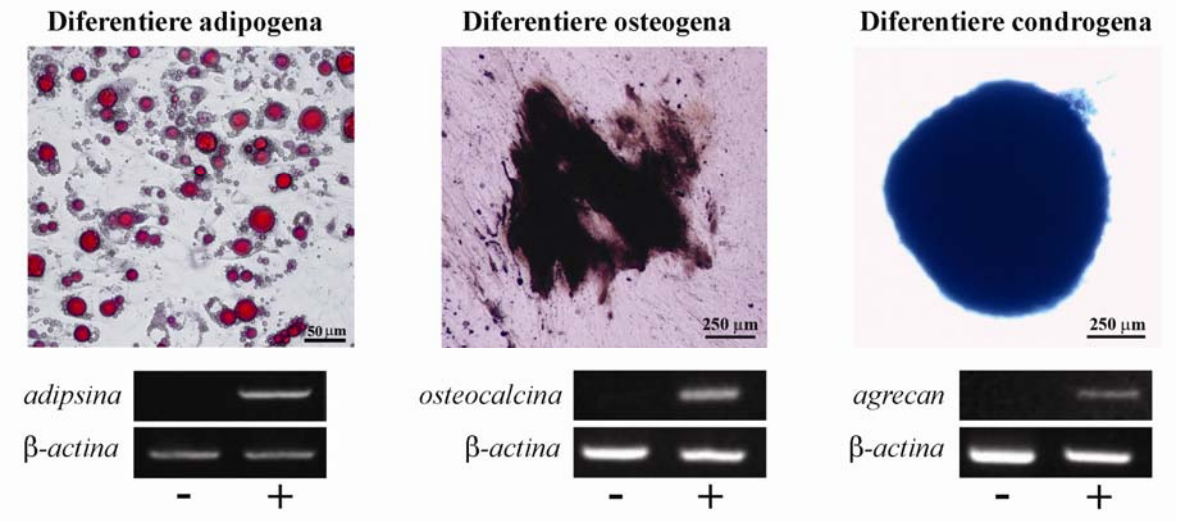


Figure 8: Characterization of MSC multipotency: Adipogenic differentiation (left panel) is shown by Oil Red staining and activation of adipsin gene expression. Osteogenic differentiation (middle panel) was confirmed by von Kossa staining and activation of osteocalcin gene expression. Chondrogenic differentiation (right panel) was confirmed by Alcian Blue staining and activation of aggrecan gene expression in differentiated cells.

III. Studies of mesenchymal stem cells differentiation

In order to assess the differentiation capacity toward CMC of MSC, the demethylating compound 5-azacytidine, known for its ability to enhance the differentiation of embryonic stem cells towards CMC was used.

A point of interest was the action of 5-azacytidine on multipotent stem cells, namely the ability of this compound to affect the ability of MSC to differentiate into multiple cell lines. The results showed that cells treated with 5-azacytidine gradually lost their ability to differentiate towards adipocytes and osteoblasts when they were incubated in specific differentiation conditions. An unexpected result was the increase of condrogenic differentiation potential induced by 5-azacytidine treatment. The conclusion of this study was that MSC keep their multipotency after the first exposure to 5-azacytidine, but their capacity to differentiate into multiple cell lines is gradually reduced with each exposure, while their capacity to generate chondrocytes is increased (Figure 9).

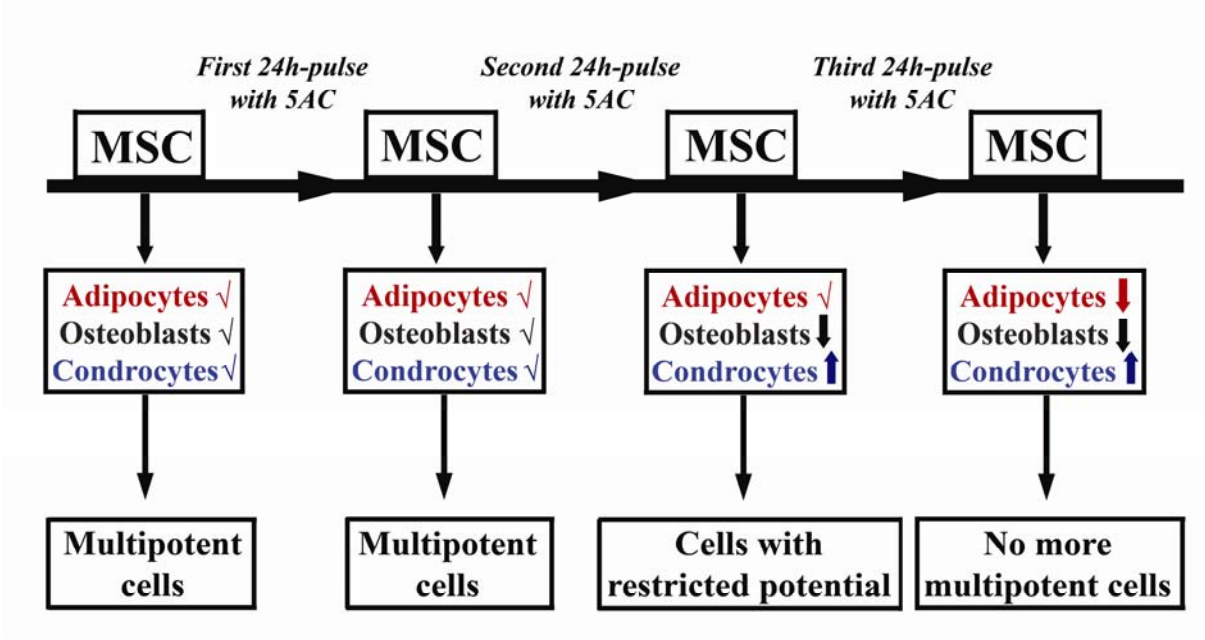


Figure 9: The effect of 5-azacytidine pulses on the multipotency of MSCs. The multipotency of MSC becomes restricted after exposure to more than one pulse of 5-azacytidine. After two or three pulses with 5-azacytidine, their capacity to differentiate into chondrocytes is considerably increased.

In the same time, the ability of 5-azacytidine to induce differentiation of MSC towards a cardiac muscle phenotype was followed. As shown in Figures 10 and 11, except for some muscle-specific genes (α-actin cardiac and L-type calcium channel), the expression of any of the genes involved in differentiation of cardiac muscle induced by this treatment. However, 5-azacytidine induced the expression of some skeletal muscle specific genes, which promoted the differentiation of MSC into myoblasts when incubated in appropriate conditions (Figure 12). In conclusion, 5-azacitidine treatment could favour MSC differentiation into cardiac cells, if specific factors that could affect the completion of the differentiation process into CMC mature and functional differentiation would be provided.

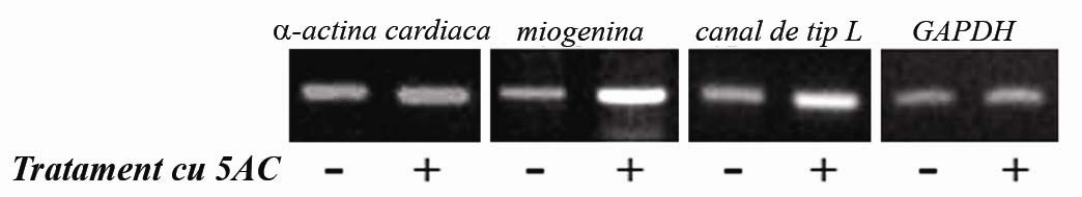


Figure 10: RT-PCR illustrating the expression of several muscle-specific genes that are elevated in MSC after one pulse with 5-azacytidine.

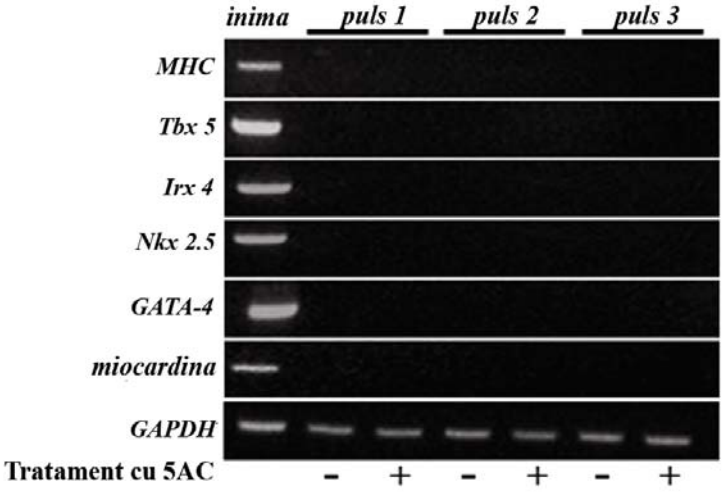


Figure 11: RT-PCR illustrating that the expression levels of genes specifically involved in cardiac differentiation are not increased in MSC by 5-azacytidine treatment.

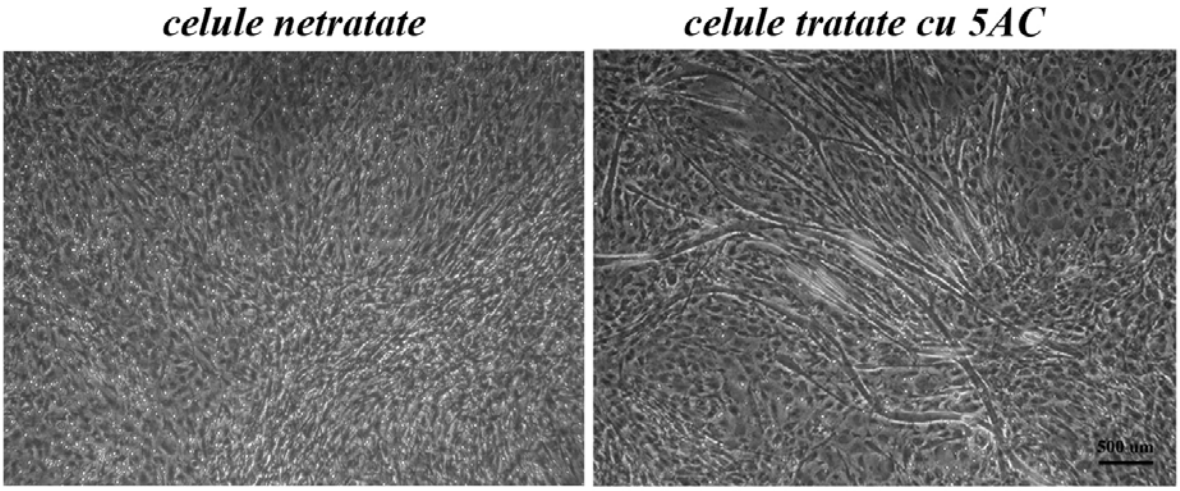
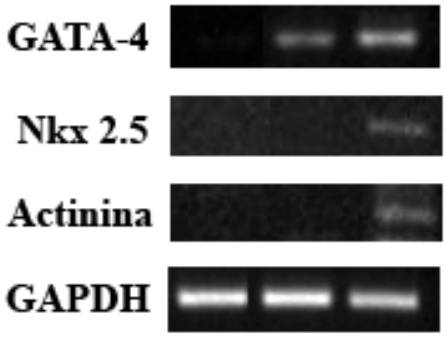


Figure 12: Phase-contrast microscopy image illustrating the appearance of myotubes in cultures of MSC incubated under serum deprivation conditions after three previous pulses with 5-azacytidine.

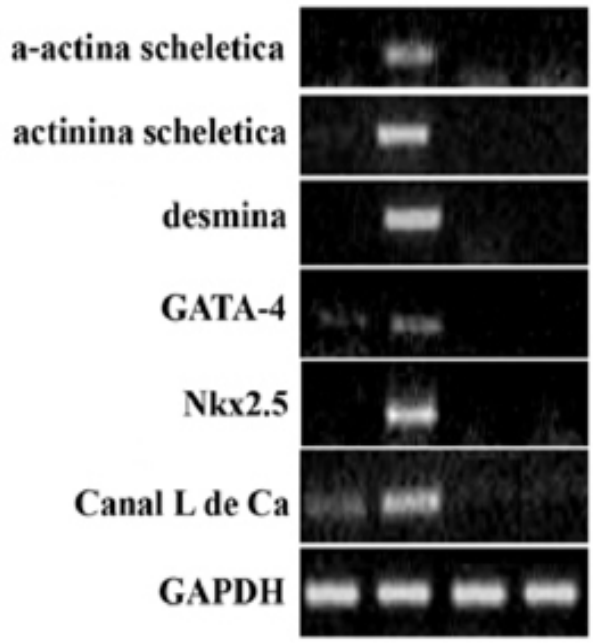
Following these observations, we found that 5-azacitidine treatment associated with direct contact with cardiac muscle cells may have a beneficial effect on differentiation into CMC of a stromal cell population. Thus, the changes in marrow stromal cells through direct contact with cardiac muscle cells combined with 5-azacitidine treatment were studied. The results showed that the two factors resulted in triggering the expression of cardiac specific transcription factors in mouse bone marrow stromal cells such as GATA-4 and Nkx2.5 (Figure 13).



CSA	+	+	+
CMC	-	+	+
5AC	-	-	+

Figure 13: RT-PCR showing induction of cardiac markers gene expression in cells treated with 5-azacitidine after 1 week of coculture with CMC. It can be noticed that the cumulative effect of the two conditions (treatment with 5-azacitidine and direct contact between stromal cells and CMC) is superior to simple contact between the two cell types.

Moreover, it was observed that expression of the latter was induced only if both differentiation stimuli were applied. In addition, actinin expression was induced, indicating differentiation towards to a striated muscle phenotype. Furthermore, the results of double chambers coculture experiments showed that combining 5-azacitidine treatment and soluble factors released from ischemic myocardium resulted in increased differentiation of bone marrow cells towards a cardiac phenotype. Thus, addition of exposure to 5-azacytidine to signals from the ischemic myocardial tissue triggered the transcription of key factors involved in cardiac differentiation, such as: muscle specific actin and striated type actinin, desmin, GATA-4, Nkx2.5 and L-type calcium channel (figure 14). Thus, it can be concluded that the initiation of differentiation induced by demethylation of certain genes is supported by the effect of some cardiac soluble factors that are able to complete this process.



Inima	+	+	-	-
CSA	+	+	+	+
5AC	-	+	-	+

Figure 14: RT-PCR showing the induction of gene expression of several cardiac markers in the presence of 5-azacytidine and local factors released from ischemic myocardium.

IV. Identification of some paracrine factors secreted by normal and hypoxic mesenchymal stem cells

Recent reports on clinical trial results showed that the beneficial effects of stem cell transplantation in myocardial infarction is transient, suggesting a paracrine effect exerted by the transplanted cells through the secretion of cardioprotective and angiogenic factors. Thus, in the last part of the thesis the anti-apoptotic effect of soluble factors released by MSC on cardiac muscle cells was studied and some factors released by MSC in normal and hypoxic conditions were identified. A particularly important observation was the MSC capacity to adapt and survive in hypoxic conditions, as demonstrated by the resistance of these cells to the hypoxic conditions induced apoptosis (Figure 15).

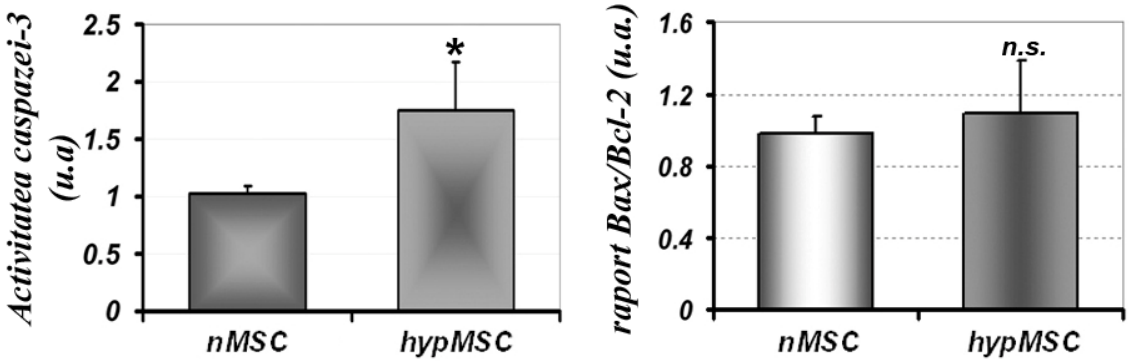


Figure 15: MSC in ischemic conditions: the graph on the left side of the figure shows a slight increase in the activity of caspase-3, while the ratio of pro-apoptotic protein Bax and anti-apoptotic protein Bcl-2 gene expression, as determined by quantitative PCR, remained unchanged (chart on the right).

MSC resistance to hypoxia-induced apoptosis is particularly important for their survival in the ischemic myocardium, where the blood vessels needed to ensure adequate oxygenation are lacking.

Our results sowed that MSC derived conditioned medium had cardioprotective effects on hypoxic CMC. Thus, the presence of MSC derived conditioned medium prevented the trigger of the apoptotic process induced by hypoxia in CMC (Figure 16) by preserving the integrity of mitochondrial membrane. By concluding, MSC transplanted in hypoxic myocardium *in vivo* might have an important contribution to the survival of the CMC affected by hypoxia and oxidative stress during reperfusion.

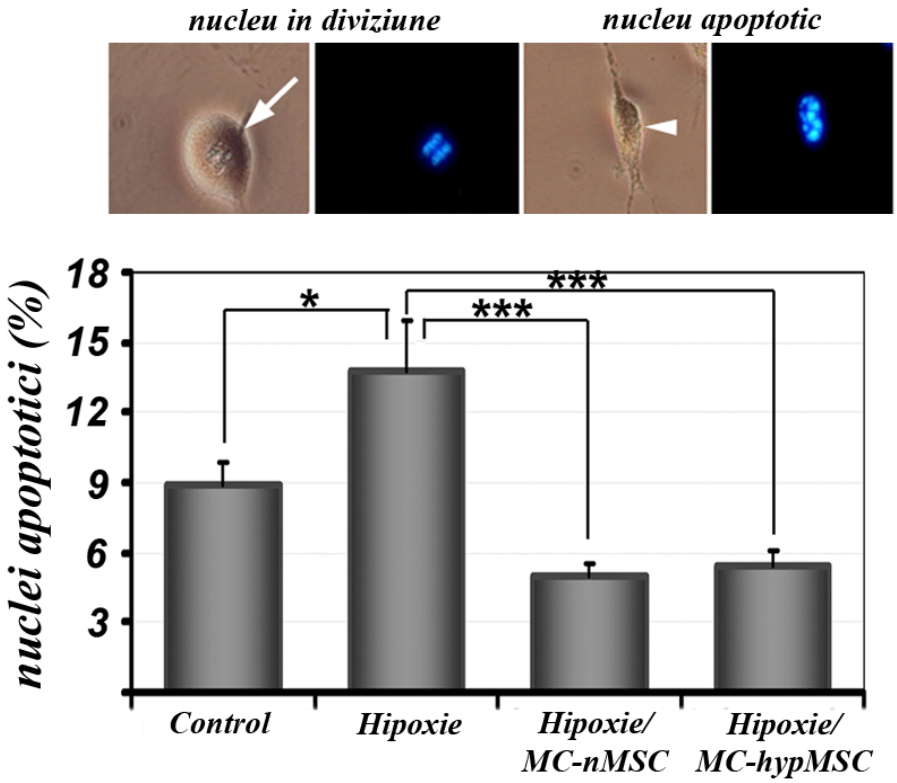


Figure 16: Quantitative determination of apoptosis in cardiac myocytes after exposure to hypoxia in the presence and absence of conditioned medium collected from MSC. The chart shoes the percentages of apoptotic nuclei determined by Hoechst staining. Images of apoptotic versus mitotic nuclei can be seen above.

Moreover, conditioned medium harvested from both normal and hypoxic MSC had similar effects, which suggested that MSC maintain their cardioprotective properties in hypoxic conditions.

Assessing the composition of MSC-conditioned medium showed that these cells are able to retain their ability to synthesize and release some cardioprotective factors such as cytokines and microRNAs. Several cytokines secreted by both normal and hypoxic MSC were identified, four of which were found in similar quantities the MSC incubated in hypoxia compared to the control: TIMP-1, MCP-1, SDF-1α and IL1ra (Figure 17). According to the literature, these factors could be responsible, at least in partially, of the cardioprotective effect exerted by the presence of MSC in the ischemic myocardium, either due to their anti-apoptotic action or by inducing angiogenesis, which is important for restoring the oxygen and nutrients supply.

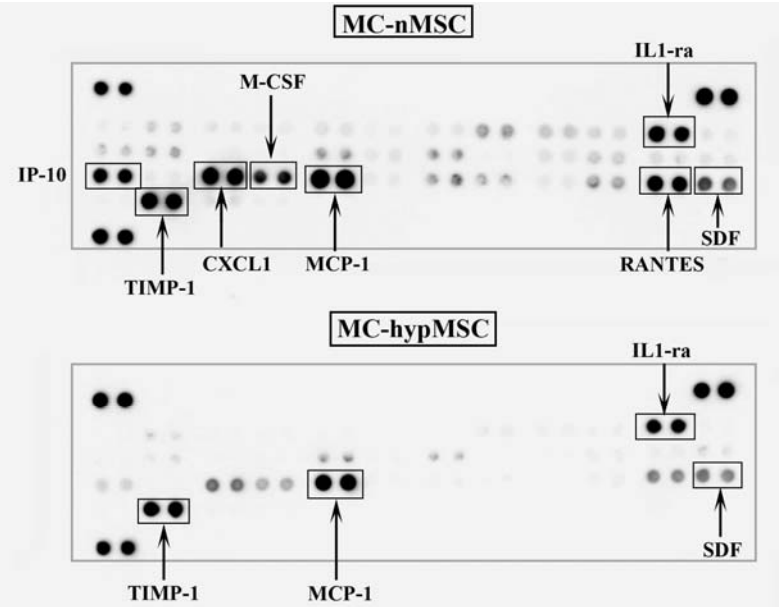


Figure 17: Citokine array showing the composition of normoxic MSC conditioned medium (upper panel) comparing to hypoxic MSC conditioned medium (lower panel).

In addition to these molecules, it appears that the transfer of genetic information between MSC and damaged cells is an important mechanism, which might have a repairing effect on injured myocardium. Thus, the hypoxic MSC derived conditioned medium contained an increased quantity of microRNAs 199a and 125b, known for their anti-apoptotic action (Figures 18 and 19).

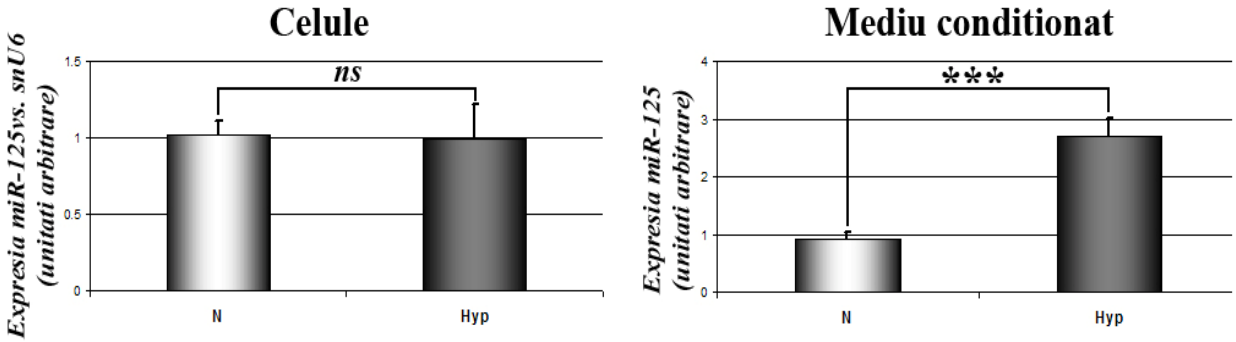


*Figure 18: Quantitative PCR showing microRNA-125 expression in normal versus hypoxic MSC (left chart) and the extracellular medium harvested from cells maintained in normal comparing to hypoxic conditions (right chart) (*** p <0.0005).*

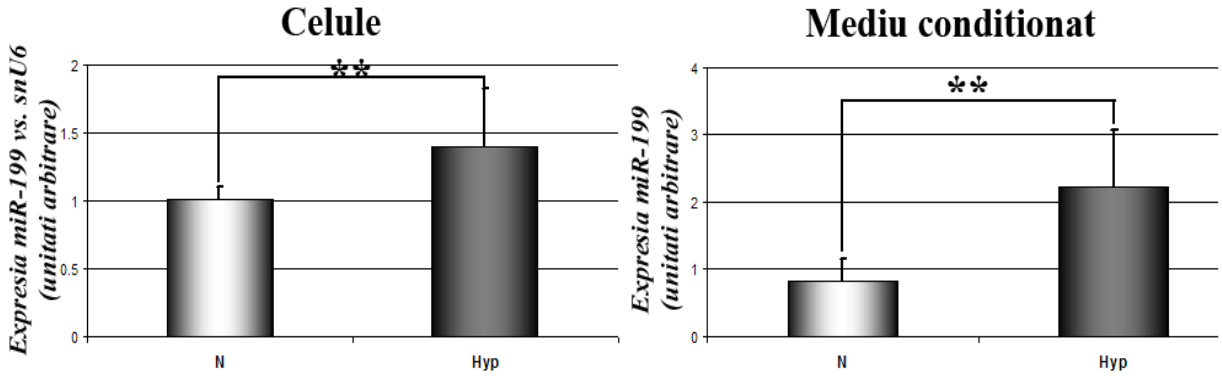


*Figura 19: Quantitative PCR showing microRNA-199a expression in normal versus hypoxic MSC (left chart) and the extracellular medium harvested from cells maintained in normal comparing to hypoxic conditions (right chart)(** $p<0.005$).*

In conclusion, the composition of MSC conditioned medium consists in a mixture of factors with either anti-apoptotic effect (TIMP-1, MCP-1, miR-199a, miR-125b), inhibitory for fibroblasts proliferation (IL1ra) or angiogenic (SDF-1α). The presence of these cardioprotective factors in MSC secretion may be responsible for anti-apoptotic effect on CMC hypoxic conditions observed in our experiments.

Conclusions

The data obtained during the doctoral stage were published in international journals with ISI impact factor and were presented at national and international scientific meetings as oral presentations or posters. Briefly, the main results were as follows:

- It has been shown that the main factor that triggers apoptosis in CMC after myocardial infarction is represented by the exogenous oxidants brought at the site of injury during reperfusion;
- A method for obtaining a population of progenitor cells obtained from bone marrow aspirate by centrifugation on Percoll discontinuous gradient was developed;
- Homogenous MSC cultures meeting the standards required by the International Society for Cellular Transplant were obtained;
- The effect of 5-azacytidine induced demethylation on the multipotency of MSC was pointed out;
- The beneficial cumulative effect of 5-azacytidine and soluble factors released by ischemic myocardium on MSC cardiac differentiation was demonstrated;

- The anti-apoptotic effect of factors released from normal and hypoxic MSC on hypoxic CMC was shown;
- Anti-apoptotic, anti-fibrotic and pro-angiogenic factors were identified in normal and hypoxic MSC derived conditioned medium.

Bibliography

1. McMurray JJ. and Pfeffer MA. Heart failure. Lancet 2005; 365: 1877-89.
2. Kuraitis D, Ruel M, Suuronen EJ. Mesenchymal stem cells for cardiovascular regeneration. Cardiovasc Drugs Ther. 2011;25(4):349-62.
3. Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. J Am Coll Cardiol. 2005 Oct 4;46(7):1339-50.
4. Rose RA, Jiang H, Wang X, Helke S, Tsoporis JN, Gong N, Keating SC, Parker TG, Backx PH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro. Stem Cells. 2008;26:2884–92.
5. Gnecchi M, Zhang Z, Ni A and Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. Circ. Res. 2008; 103: 1204-19.
6. Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. Nephrol Dial Transplant. 2011 May;26(5):1474-83.
7. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. Curr. Opin. Hematol. 2004;11(3):156-64.
8. Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. Circulation 2005; 112: 214-23.

Institutul de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” si **UNITATEA EXECUTIVA PT FINANTAREA INVATAMANTULUI SUPERIOR, A CERCETARII DEZVOLTARII SI INOVARII**

PN-III-P1-1.1-TE-2019-2044 (acronim A2A)
„Peptide derivate din apolipoproteina A-II cu potential terapeutic in ateroscleroza”

REZUMAT RAPORT ŞTIINŢIFIC
privind implementarea proiectului in perioada 15/09/2020– 30/11/2022

In cadrul proiectului de cercetare **PN-III-P1-1.1-TE-2019-2044 (acronim A2A)** cu titlul: „Peptide derivate din apolipoproteina A-II cu potential terapeutic in ateroscleroza” au fost realizate toate obiectivele si activităţile planificate in cadrul proiectului:

Etapa 1 (15/09/2020 - 31/12/2020) - Obţinerea plasmidelor recombinante pentru obtinerea adenovirusurilor care codifică diverse peptide derivate din apoA-II

Activitatea 1.1 - Obţinerea plasmidelor recombinante care codifică peptide derivate din ApoA-II pt amplificarea adenovirusurilor specifice au fost efectuate in mai multe etape:
(i) recombinarea constructilor care codifica pt apoA-II în bacterii BJ5193 care conţin pAdEasy-1 prin transformarea chimică în bacterii;
(ii) selectarea clonelor recombinante pozitive prin PCR;
(iii) amplificarea clonelor recombinante pozitive selectate folosind bacterii DH5a.

Etapa 2 (01/01/2021 - 31/12/2021) **-** Generarea de adenovirusuri recombinante care peptide derivate apoA-II cu cisteina (SSCH1, SSCH2, SSCH3, SSCH1H2, SSCH2H3), precum apoA-II cu lungime completa
Activitatea 2.1 - Generarea de adenovirusuri recombinante care peptide derivate apoA-II cu precum apoA-II cu lungime comleta
Activitatea 2.2 - Amplificarea adenovirusurilor recombinante care peptide derivate apoA-II cu precum apoA-II cu lungime completa
Activitatea 2.3 - Purificarea adenovirusurilor care peptidele derivate din apoA-II,
Activitatea 2.4 - Titrarea adenovirusurilor care peptidele derivate din apoA-II.

Etapa 3 (01/01/2022 - 30/11/2022) - Evaluarea capacităţii peptidelor derivate din apoA-II de a regresa placa aterosclerotice folosind un model murin de ateroscleroză.
Activitatea 3.1 - Administrarea dietei bogată în grăsimi la şoarecii apoE deficienti,
Activitatea 3.2 - Transductia soarecilor cu diferite forme truncate de apoA-II,
Activitatea 3.3 - Evaluarea nivelului total/HDL/LDL-colesterol şi trigliceride in probele de sânge de la şoarecii transduşi,
Activitatea 3.4 - Caracterizarea lipoproteinelor de la şoarecii transduşi cu formele truncate ale apoA-II,
Activitatea 3.5 – Testarea capacităţii de eflux a colesterolului de la şoarecii transduşi cu formele truncate ale apoA-II,
Activitatea 3.6 - Analiza evoluţiei plăcilor aterosclerotice la şoarecii apoE deficienti transdusi cu forme truncate ale apoA-II.

Rezumat Raport Etapa 1. Prin clonare moleculara, au fost obţinuţi şase construcţi conţinând diferite fragmente ale genei apoA-II inserate în vectorul pADTrack. Construcţii obţinuţi conţin secvenţa semnal (SS), aminoacidul cisteina din poziţia 6 (C) şi câte unul sau doua helixuri (H1, H2, H3) ale apoA-II. Aceşti construcţi au fost notaţi astfel: 1.SS-C-H1, 2.SS-C-H2, 3.SS-C-H3, 4.SS-C-H1H2, 5.SS-C-H2H3.

Etapele de obţinere a construcţilor cu fragmente apoA-II inserate în pADTrack au fost urmatoarele:

1. Obţinerea fragmentelor apoA-II s-a realizat prin overlapping PCR. Fragmentele de ADN amplificate prin PCR au fost separate prin electroforeza in gel de agaroză 1% colorat cu MidoriGreen. Benzile corespunzătoare fragmentelor apoA-II au fost excizate din gelul de agaroză, iar ADN a fost izolat si purificat din gel folosind un kit Promega (Wizard SV gel and PCR Clean-up System).
2. Clivarea capetelor ADN cu enzimele Kpn I si Xho I
3. Ligarea insertului (fragment apoA-II) în vectorul pADTrack folosind T4 ADN ligază
4. Selecţia clonelor care au integrat insertul (fragment apoA-II) în vectorul pADTrack

Fragmentele apoA-II clonate în pADTrack au fost utilizate pt recombinare in bacterii competente BJ5183.Recombinarea ADN in bacterii competente BJ5183 s-a realizat cu kitul Mix&Go Transformation. Simultan cu cele cinci fragmente apoA-II, a fost recombinat şi apoA-II total (SS-C-H1H2H3) clonat în vectorul pAD Track. Etapele recombinarii ADN au fost urmatoarele:

1. Digestia ADN cu enzima de restrictie PmeI
2. Izolarea si purificarea ADN cu fenol/cloroform/alcool izoamilic
3. Transformare bacteriana cu bacterii competente BJ5183
4. Selecţia clonelor prin „PCR negativ": PCR cu primerii pAD Track 4631F si pAD track 5616R.
5. Selecţia clonelor prin „PCR pozitiv" prin care a fost testata prezenta fiecărui fragment apoA-II.
6. Liza alcalină a culturilor bacteriene.
7. Re-transformarea ADN recombinant in bacterii competente DH5α

După confirmarea prin digestie enzimatică cu PacI şi PstI, din fiecare clona pozitiva selectata s-a realizat amplificarea ADN in bacterii DH5a si s-a obtinut o cantitate mare de ADN.

Rezumat Raport Etapa 2. Etapele de obţinere a adenovirusurilor recombinante care codifica peptide derivate din apoA-II au fost:

i. Recombinarea constructilor in pAdTrack cu pAdEasy-1 in bacterii BJ5183

ii. Selectarea clonelor pozitive prin PCR si digestie cu enzime de restricţie (ex: KpnI, PstI si HindIII)

iii. Impachetarea particulelor adenovirale in celule AD293.

Pentru recombinarea constructilor in pAdTrack cu pAdEasy-1, bacteriile BJAdEasy (#16399 Addgene) competente au fost preparate folosind kitul Mix&Go E.coli Transformation Kit (Zymo Research). După obtinerea ADN recombinant in pAdTrack cu pAdEasy-1, acesta a fost verificat prin PCR si digestie enzimatica. După confirmarea prin digestie enzimatică, din fiecare clona pozitiva selectata s-a realizat amplificarea ADN in bacterii DH5a si s-a obtinut o cantitate mare de ADN.

Pentru amplificarea adenovirusurilor recombinante care codifică peptide derivate din apoA-II cu cisteină precum şi apoA-II cu lungime completă, celulele AD293 au fost insamantate in flaskuri T25 si transfectate cu ADN recombinant linearizat cu enzima de restricţie PacI. Dupa 12 zile, mediul cu celule transduse a fost colectat si centrifugat. Sedimentul celular a fost resuspendat in PBS si supus unor cicluri de inghetare (in azot lichid) - dezghetare (la 37°C) succesiv de trei ori, apoi a fost trecut prin seringa (23G). Atat mediile colectate cat si sedimentele obtinute au fost adaugate peste celule AD293 (insamantate cu o zi inainte). Adenovirusurile au fost amplificate succesiv in flask-uri T75 → T175 → 5 flaskuri T175 → ≥ 25 flaskuri T175. Intrucat vectorul adenoviral utilizat in obtinerea adenovirusurilor (care codifica pentru proteina ApoA-II) produce si proteina fluorescenta verde (GFP), celulele care au produs adenovirusul au putut fi monitorizate si prin microscopie de fluorescenta. Adenovirusurile din mediu au fost precipitate utilizand sulfat de amoniu, dupa care a fost realizata purificarea adenovirusurilor prin ultracentrifugare in gradient de CsCl urmata de dializa. Celulele care au produs adenovirusurile au fost colectate, centrifugare si supuse unor cicluri consecutive inghet/dezghet. In continuare s-a efectuat purificarea adenovirusurilor prin ultracentrifugare in gradient de CsCl si dializa.

Titrarea adenovirusurilor care codifică peptidele derivate din apoA-II a fost realizata prin citometrie in flux, in urma transducerii celulelor AD293 cu dilutii seriale ale virusurilor purificate. Titrul viral al adenovirusurilor care codifică peptide derivate apoA-II cu cisteină precum şi apoA-II cu lungime completă a fost cuprins intre 1.7-4,3x1011 TU/ml. (TU=Transforming Units).

Rezumat Raport Etapa 3. Efectele transductiei cu forme truncate de apoA-II in modelul murin de ateroscleroză au fost evaluate la intervale diferite de timp: I. la timp scurt si II. la timp lung.

I. Femele apoE-/-, in varsta de 6 luni, au fost impartite in cinci loturi experimentale (n=3/grup), pentru fiecare dintre cele 4 adenovirusuri si un grup sham. Soarecii au fost injectati cu suspensie adenovirala (100 µl), intravenos, in vena laterala caudala, folosind o doza de 5x10^9 TU/ml, sau vehicul folosit pentru prepararea suspensiei virale (PBS). Titrul viral al adenovirusurilor care codifică peptide derivate din apoA-II precum şi apoA-II total a fost cuprins intre 1.7-4,3x10^{11} TU/ml. Pe parcursul intregului experiment, animalele au primit hrana si apa ad libitum, iar starea generala si greutatea acestora a fost monitorizata. La 4 zile dupa transductie si dupa 5 ore de fasting, animalele au fost anesteziate cu un cocktail de ketamina/xilazina/acepromazina (80/10/2 mg/kg corp), iar sangele a fost recoltat prin punctie intracardiaca pentru obtinerea plasmei. Ulterior, animalele au fost perfuzate intracardiac cu PBS si s-a realizat prelevarea chirurgicala a lobului hepatic stang. Tesutul hepatic a fost prelucrat pentru analiza ARN. Plasma a fost utilizata pentru urmatoarele analize: 1) determinarea valorilor colesterolului si trigliceridelor, 2) analiza expresiei apoAI si apoAII murin prin ELISA, 3) determinarea aspectului si dimensiunii particulelor HDL in fractii prin microscopie electronica de transmisie si Nanosizer si 4) determinarea activitatii PON-1 in fractii.

Masculi apoE-/-, in varsta de 4 luni, au fost impartiti in cinci loturi experimentale (n=4/grup), pentru fiecare dintre cele 4 adenovirusuri si un grup sham. Soarecii au fost injectati cu suspensie adenovirala (100 µl), intravenos, in vena laterala caudala, folosind doze de 10^8 TU/ml, 5*10^8 TU/ml, 10^9 TU/ml, 5x10^9 TU/ml si 10^10 TU/ml sau vehicul folosit pentru prepararea suspensiei virale (PBS). Pe parcursul experimentului, animalele au primit hrana normal si apa ad libitum, iar starea generala si greutatea acestora a fost monitorizata. La 7 zile dupa transductie, animalele au fost anesteziate cu un cocktail de ketamina/xilazina/acepromazina (80/10/2 mg/kg corp) si sangele a fost recoltat prin punctie intracardiaca pt obtinerea plasmei. Ulterior, animalele au fost perfuzate intracardiac cu PBS si s-a realizat prelevarea chirurgicala a ficatului. Acesta a fost utilizat pt analiza IVIS a transductiei adenovirale. Plasma a fost utilizata pt determinarea valorilor colesterolului si trigliceridelor si pt analiza expresiei apoA-I murin prin ELISA.

Ficatul soarecilor apoE-/- injectati cu adenovirus care codifica apoA-II si forme truncate ale apoA-II a fost transdus cu succes (in special in cazul soarecilor transdusi cu apoA-II se observa benzi de ADN bine conturate), iar adenovirusurile injectate sunt pure, ADN extras fiind amplificat cu primerii specifici fiecarui fragment al apoA-II (cu exceptia adenovirusului care codifica fragmentul H1 al apoA-II).

Rezultatele au aratat ca cea mai mare concentratie de apoAI murin se gaseste in plasma soarecilor apoE-/- injectati cu 5*10^9 TU/ml de adenovirus care codifica apoA-II, concentratia plasmatica cea mai redusa de apoAI murin fiind la soarecii injectati cu 10^8 TU/ml de adenovirus. In urma transductiei adenovirale, concentratia de triglyceride si de colesterol total in plasma a crescut la toate grupele de soareci, comparativ cu grupul control. Imaginile de microscopie electronica de transmisie a HDL din fractia 8 de lipoproteine izolata de la soarecii apoE-/- transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si fragmentul H3 al apoA-II, la 4 zile post-transductie. 5 µl din au aratat o heterogenitate in ceea ce priveste aspectul si dimensiunea particulelor HDL la cele 3 grupe de soareci analizati.

Cuantificarea expresiei proteice a apoA-II murin in plasma de la soarecii apoE-/- transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si forme truncate ale apoA-II a fost realizata prin ELISA de tip sandwich, la 4 zile post-transductie, utilizand un kit specific. S-a observat ca cele mai mari concentratii ale apoA-II murin au fost intalnite la soarecii injectati cu adenovirus care codifica fragmentul H3 al apoA-II, in timp ce concentratia minima este atribuita soarecilor transdusi cu adenovirus care codifica fragmentul H1 al apoA-II.

Concentratia de trigliceride in fractii izolate de la soarecii apoE-/- transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si forme truncate ale apoA-II a fost determinata prin utilizarea unui kit specific de dozare, la 4 zile post-transductie. In urma transductiei adenovirale, concentratia de trigliceride a prezentat valori maxime in fractia 9 la soarecii din grupul H1 si sham. De asemenea, au fost observate valori crescute ale concentratiei de colesterol in fractiile de VLDL la toate grupele de soareci, in special la grupul H1. Valorile maxime ale concentratiei de colesterol in fractiile de HDL au fost observate in fractia 8 la toate grupele de soareci, la grupul H2 si grupul H3 inregistrandu-se cele mai ridicate valori.

Activitatea PON-1 a fost determinata in fractii izolate de la soarecii apoE-/- transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si forme truncate ale apoA-II. S-a observat o initiere a activitatii PON-1 in fractii incepand cu fractia 7 (la grupul de soareci H1, H3 si A2) sau fractia 8 (grupul de soareci H2 si sham), cu un

maxim de activitate in fractia 9 si un minim de activitate in fractia 11 pentru toate grupele de soareci. De asemenea, PON-1 este cea mai activa in grupele de soareci H3 si H1, la polul opus situandu-se grupele de soareci H2 si A2. Ptoteinele apoA-II precum si fragmentele H1 si H2 derivate din apoA-II au fost vizualizate pe gel de poliacrilamida 15% prin coloratie Pierce Silver. Au fost observate benzi proteice corespunzatoare fragmentelor H1 si H2 ale apoA-II in fractia 10, avand masa moleculara de pana in 10 kDa, precum si benzi proteice corespunzatoare apoA-II in fractiile 9-12, cu masa moleculara cuprinsa in intervalul 15-20 kDa.

II. Femele apoE-/-, in varsta de 3 luni, au fost impartite in cinci loturi experimentale (n=7/grup), pentru fiecare dintre cele 4 adenovirusuri si un grup sham. Soarecii au fost injectati saptamanal, timp de trei saptamani, cu suspensie adenovirala (100 µl), intravenos, in vena laterala caudala, folosind doza de 5x10^9 TU/ml, sau cu vehicul folosit pt prepararea suspensiei virale (PBS). Pe parcursul intregului experiment, animalele au primit hrana si apa *ad libitum*, iar starea generala si greutatea acestora a fost monitorizata. Dupa transductie, a fost realizata saptamanal dozarea de colesterol total si de trigliceride in plasma la fiecare 3 zile respectiv 6 zile dupa fiecare injectie. Pentru aceasta, de la fiecare animal s-a recoltat un volum de sange de ~ 75 µl prin tehnica de ciupire a cozii (tail snip), inainte de transductie pentru timpul 0, iar dupa transductie, la 3 si respectiv 6 zile dupa fiecare injectie. La 3 saptamani de la prima transductie si dupa 5 ore de fasting, animalele au fost anesteziate cu un cocktail de ketamina/xilazina/acepromazina (80/10/2 mg/kg corp) si sangele a fost recoltat prin punctie intracardiaca pentru obtinere de plasma. Plasma a fost utilizata pentru determinarea valorilor colesterolului si trigliceridelor.

Concentratia de trigliceride in plasma soarecilor apoE-/- transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si forme truncate ale apoA-II, a fost determinata prin utilizarea unui kit specific de dozare, la fiecare 3, respectiv 6 zile post-transductie. Valorile maxime ale concentratiei trigliceridelor in plasma au fost inregistrate in urma administrarii celei de-a treia doze adenovirale, respectiv in ziua 15 post-transductie, la toate grupele de soareci, in timp ce valorile minime, au fost observate in ziua 17 post-transductie. Concentratia de trigliceride in fractii izolate din plasma soarecilor apoE-/- transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si forme truncate ale apoA-II, determinata prin utilizarea unui kit specific de dozare, la 24 zile post-transductie. Post-transductie, concentratia de triglyceride a prezeintat un peak in fractia 6 la grupele H2 si A2, in timp ce la grupul H3 acest peak se afla in fractia 7, iar la grupul H1 este in fractia 10.

Concentratia de colesterol in plasma soarecilor apoE-/- transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si forme truncate ale apoA-II, a fost determinata prin utilizarea unui kit specific de dozare, la fiecare 3, respectiv 6 zile post-transductie. Valorile maxime ale concentratiei de colesterol in plasma au fost inregistrate in ziua 14 post-transductie la grupul H1, respectiv in ziua 17 la grupurile H2 si H3. La 24 de zile post-transductie, toate grupele de soareci au prezentat valori minime ale concentratiei de colesterol, dar mai mari decat cele de la momentul zero. La grupul A2, in intervalul de zile 10-17 au fost observate valori mai reduse ale concentratiei de colesterol fata de celelalte grupe de soareci. Concentratia de colesterol in fractiile VLDL la soarecii apoE-/- transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si forme truncate ale apoA-II, a fost determinata prin utilizarea unui kit specific de dozare, la fiecare 3, respectiv 6 zile post-transductie. Concentratiile de colesterol in fractiile VLDL au fost uniforme pt grupele de soareci utilizate in experiment, exceptie facand grupul A2, unde valorile inregistrate pt concentratia de colesterol au fost mai ridicate fata de restul grupelor. Concentratia de colesterol in fractiile HDL la soarecii apoE-/- transdusi cu adenovirus care codifica apoA-II si forme truncate ale apoA-II, au fost determinata prin utilizarea unui kit specific de dozare, la fiecare 3, respectiv 6 zile post-transductie. In fractiile 8 si 9, concentratiile de colesterol au prezentat valori minime pt grupele de soareci H1, H2 si H3. La grupul A2 concentratiile de colesterol au fost mai ridicate decat la restul grupelor in fractiile de HDL.

De asemenea, a fost evaluat potentialul formelor truncate ale apoA-II de a reduce leziunile aterosclerotice prin promovarea efluxului de colesterol la soareci apoE-/- injectati cu adenovirus care codifica apoA-II si forme truncate ale apoA-II. Cuantificarea leziunilor a aratat o reducere semnificativa a suprafetei lezionale la animalele transduse cu adenovirus care codifica fragmentul H1 al apoA-II comparativ cu grupul control. Scaderi semnificative s-au obtinut si pt grupurile de animale H2 si H3, comparativ cu grupul control.

Toate rezultatele obtinute reprezinta materialul pt un articol stiintific care este in pregatire pt publicare.

Diseminarea rezultatelor

Rezultatele obţinute in cadrul proiectului au fost prezentate la următoarele manifestări ştiinţifice:

- **„Generation of recombinant adenoviruses encoding ApoA-II**", autori Gabriela Florea, Irina F. Tudorache, Violeta G. Trusca, Laura Moise, Madalina Fenyo, Anca V. Gafencu, poster prezentat la 45th European Lipoprptein Club (ELC) Meeting, Tutzing, Germany, 04-08.09.2022
- "**Generation of recombinant adenoviruses encoding ApoA-II**", Gabriela Florea, Irina F. Tudorache, Violeta G. Trusca, Anca V. Gafencu, poster prezentat la „A 23 a Conferinta Internationala: Materials, Methods & Technologies", organizata in Burgas, Bulgaria in perioada 19-22 August 2021
- "**An optimised method to obtain recombinant adenoviruses**", prezentare orala sustinuta de catre Violeta Trusca la „A 23 a Conferinta Internationala: Materials, Methods & Technologies", organizata in Burgas, Bulgaria in perioada 19-22 August 2021
- **„Generation of recombinant adenoviruses encoding ApoA-II**", autori Gabriela Florea, Irina F. Tudorache, Violeta G. Trusca, Laura Moise, Madalina Fenyo, Anca V. Gafencu, poster prezentat la simpozionul aniversar „International Conference under the aegis of the Romanian Academy - The 42nd Anniversary Symposium of The Institute of Cellular Biology And Pathology "Nicolae Simionescu" held jointly with The 38th Annual Scientific Session of The Romanian Society For Cell Biology - "From basic cell biology to personalized medicine during Covid-19 pandemic; creativity and vision in a rapidly changing world", 4-6 Noiembrie, 2021.
- **„Understanding apolipoprotein gene regulation, a key step toward the development of successful therapies for reduction of atherosclerosis",** prezentare orala sustinuta de catre Violeta Trusca la simpozionul aniversar „International Conference under the aegis of the Romanian Academy - The 42nd Anniversary Symposium of The Institute of Cellular Biology And Pathology "Nicolae Simionescu" held jointly with The 38th Annual Scientific Session of The Romanian Society For Cell Biology - "From basic cell biology to personalized medicine during Covid-19 pandemic; creativity and vision in a rapidly changing world", 4-6 Noiembrie, 2021.

Publicaţii:

- „**Apolipoprotein A-II, a Player in Multiple Processes and Diseases**", Gabriela Florea, Irina Florina Tudorache, Elena Valeria Fuior, Radu Ionita, Madalina Dumitrescu, Ioana Madalina Fenyo, Violeta Georgeta Bivol, Anca Violeta Gafencu, Biomedicines, 2022.
- „***The* Promise *of Apolipoprotein AI-Based Therapy***", Trusca VG, Austin Journal of Molecular and Cellular Biology, 2021.

In concluzie, obiectivele proiectului **PN-III-P1-1.1-TE-2019-2044** au fost îndeplinite in totalitate.

L'Academie Roumaine

L'Institute de Biologie et Pathologie Cellulaire "Nicolae Simionescu"

THESE DE DOCTORAT

Les mécanismes épigénétiques impliqués dans la différenciation des cellules souches

Directeur de doctorat

Acad. Maya Simionescu

Doctorant

Florin Iordache

Bucarest

2013

Contenu

INTRODUCTION

PARTIE I. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

CHAPITRE I.1 Cellules progénitrices endothéliales 6

I.1.1 Définition et les caractéristiques des cellules souches 6

I.1.2 Classification et types de cellules souches 8

8I.1.3 Cellules progénitrices endothéliales présentes dans le sang de cordon ombilical…....18

I.1.4 Applications cliniques des cellules progénitrices endothéliales en pathologie cardiovasculaire.....22

CHAPITRE I.2 Mécanismes épigénétiques et leur rôle dans la différenciation cellulaire

I.2.1 Définition et caractéristiques des modifications épigénétiques 31

I.2.2 Classification et types de modifications épigénétiques 32

I.2.2.1 Méthylation ADN.....32

I.2.2.2 Changements dans histone 34

a. Méthylation

b. Acétylation

c. Phosphorylation

d. Sumoilation

e. Ubiquitinilation

f. Proline isomérisation

g. ADP-ribosylation

h. Deimination

I.2.2.3 microARN.....47

Chapitre I.3 Mécanismes d'acétylation des histones et de leur rôle dans la différenciation cellulaire……57
I.3.1 Définition et caractéristiques de l'acétylation ……..57
I.3.2 Classification des enzymes impliquées dans l'acétylation: 59
I.3.2.1 histone acétyltransférase (HAT) 60
I.3.2.2 histone déacétylase (HDAC) 65
I.3.3 Les mécanismes d'action de l'acétylation des protéines histones et nonhistonice 72
I.3.4 Le rôle de l'acétylation dans la différenciation des cellules souches 78

PARTIE II CONTRIBUTIONS ORIGINALES 84
II.1 But et Objectif.....84
II.2 Matériels et méthodes.....86
II.3 Résultats et discussion.....106
II.3.1 L'isolement et la caractérisation de cellules progénitrices endothéliales de le sang de cordon ombilical…….....106
II.3.2 Enquête de niveaux de l'acétylation des histones dans les cellules progénitrices...119
II.3.3 Effet de l'acétylation des histones sur la différenciation de cellules progénitrices.125
II.3.4 Analyse d'acétylation de facteurs de transcription impliqués dans la morphogenèse carviovasculaire……..129
II.3.5 Influence de l'acétylation des histones sur le processus de néovascularisation « in vitro ».....131
II.4 Conclusions.....145
Bibliographie.....148
Diffusion des résultats obtenus dans la thèse 172
Financement de la recherche……178

Mots-clés

Acétylation
Histone
Chromatine
Epigénétique
Cellules Souches
Cellules progénitrices endothéliales
Cellules Souches Fœtales
Différenciation
Néovascularisation
Maladies cardiovasculaire

Résumé

Importance de l'étude

La compréhension des mécanismes qui conduisent à la différenciation de cellules souches est l'objet principal de nombreuses études. L'accessibilité de l'ADN à des facteurs de transcription dépend de la structure de la chromatine et de le degré de compactage. Analyses récentes des modifications épigénétiques dans les cellules souches humaines et murines ont fourni de nouvelles données sur les propriétés des cellules souches pluripotentes et de leur capacité de différenciation. Ces mécanismes conduisent à une hiérarchie de la transcription qui est induite par des facteurs de transcription et sont conçus pour contrôler l'expression du gène sans altérer l' ADN. La capacité des cellules souches multipotentes diminue avec le temps en raison de la répression de certains gènes qui ont une "signature" épigénétique. Les gènes actifs dans les cellules souches sont rendues silencieux progressivement avec le passage de leurs ancêtres, et un autre sous-ensemble de gènes spécifiques de tissus sont activés. Cette progression est obtenue par une expression sélective de facteurs de transcription qui reconnaissent et interagissent avec diverses modifications épigénétiques de la chromatine. A la suite de ces événements, la chromatine devient accessible pour la transcription dans certaines régions, ce qui permet la différenciation spatiale et temporelle nécessaire pour les cellules souches de commande. Par exemple, la protéine HP1 (protéine de l'hétérochromatine1) change sa distribution d'une localisation dispersée dans des cellules souches embryonnaires a l’une plus concentrée dans loci distincts lors de la différenciation cellulaire. L'acétylation des histones a été considérée comme un phénomène en corrélation avec une conformation de la chromatine ouverte qui a permis l'expression de différents gènes impliqués dans la différenciation. Actuellement il est observé que dans l'état acétylé, des nombreux gènes sont réprimés et donc la différenciation à une lignée cellulaire spécifique est bloquée, en les maintienent dans l'état pluripotent. Manipulation de l’activité des histone déacétylase pourrait être un outil utile pour générer des populations de cellules spécifiques dans le but de les utiliser dans la transplantation.

Découvrir les modèles d'acétylation ("*acetylation signature*") impliqués dans la différenciation des cellules souches de différents types de cellules, ouvrant de nouvelles opportunités à l'interface entre la chimie et la biologie des cellules souches, et peuvent fournir des informations précieuses pour améliorer les applications des cellules souches dans l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative.

Dans ce contexte, **l' objectif de cette thèse** est d'étudier le rôle de l'acétylation des histones dans la différenciation des cellules progénitrices endothéliales par l'analyse de l'expression de marqueurs génétiques différents et des facteurs de transcription qui régulent l'activité de ces gènes. En outre, les études portant sur l'effet de l'acétylation sur le processus de cellules progénitrices endothéliales dans la néovascularisation *in vitro*.

La thèse est divisée en deux grandes parties : Partie I - L'état actuel des connaissances et de la Partie II - Contributions originales.

La première partie présente l'état actuel des connaissances et est organisé en trois sections.

Sous-chapitre I présent des notions sur les caractéristiques et les propriétés des cellules souches. Dans ce chapitre est présenté le modèle cellulaire utilisé, représenté par les cellules progénitrices endothéliales et leurs applications cliniques potentielles.

Sous-chapitre II fait un aperçu des principales modifications épigénétiques. Il décrit les mécanismes d'action de ces changements et les enzymes impliquées dans leur mise en œuvre. Également dans cette section est décrit le rôle des modifications épigénétiques dans la différenciation des cellules souches à diverses lignées cellulaires.

Sous-chapitre III décrit les mécanismes des acétylation des histones et leur rôle dans la différenciation des cellules souches. Ce chapitre présente les principales catégories d' histone acétyltransférase et les histones désacétylases , les mécanismes d'action de l'acétylation de l'histone et l'influence de l'acétylation sur la différenciation de cellules progénitrices endothéliales.

Dans la deuxième partie - « Contributions originales » sont présentés les résultats d'expériences visant à étudier le rôle de l'acétylation des histones dans la différenciation des cellules progénitrices endothéliales et la capacité de la néovascularisation *in vitro*.

Chapitre II.2 - " Matériels et Méthodes " décrit les principaux matériaux et techniques utilisés dans les expériences, y compris de nombreuses techniques et de la biologie cellulaire et moléculaire: PCR en temps réel, Western blot, cytométrie en flux, la microscopie électronique à

transmission et à balayage, immunocytochimie et immunohistochimie, méthodes colorimétrique et fluorimétriques.

Chapitre II.3 - " Résultats et discussion " présente les principaux résultats originaux obtenus dans les études.

Résultats et discussion

La compréhension des mécanismes qui conduisent à la différenciation de cellules souches est l'objet principal de nombreuses études. Analyses récentes des modifications épigénétiques dans les cellules souches humaines et murines ont fourni de nouvelles données sur les propriétés des cellules souches pluripotentes et de leur capacité de différenciation. Ces mécanismes conduisent à une hiérarchie de la transcription qui est induite par des facteurs de transcription qui sont destinés à contrôler l'expression de gènes sans modifier la structure de l'ADN. L'acétylation des histones est considérée comme un phénomène en corrélation avec une conformation de la chromatine ouverte, permettant l' expression de différents gènes impliqués dans la différenciation. Actuellement c'est observé que dans l'état acétylé, de nombreux gènes sont réprimés et donc la différenciation à une lignée cellulaire spécifique est bloqué, avec le maintien de l'état pluripotent.

Dans cet étude, nous avons montré que le sang de cordon ombilical contient une riche population de cellules progénitrices endothéliales avec un profil de l'immunophénotype caractéristique: CD31, CD34, CD133, CD144, CD146, VEGFR2. L'analyse moléculaire des cellules obtenues à partir de sang de cordon ombilical a montré que dans ces cellules sont exprimés a la fois les gènes impliqués dans la morphogenèse cardiovasculaire, des gènes pour des facteurs de transcription GATA2, GATA3, GATA4, et les gènes caractéristiques des cellules endotheliales: CD31, VE -cadhérine, VEGFR1, VEGFR2, vWF, CXCR4, Tie-2. Nous avons également montré que les cellules progénitrices endothéliales ont une grande capacité de prolifération et de migration en comparaison avec d'autres cellules souches fœtales. Ces cellules peuvent prendre LDL acétylé, et la lectine *Ulex europaeus*, réseau vasculaire peut être formé, qui montrent leur potentiel dans l'angiogenèse et dans la réparation vasculaire. Cela a été confirmé en utilisant des sections ventriculaires embryonnaires murines viable ou soumis à une ischémie, sur lesquelles on a montré que les cellules progénitrices endothéliales ont la capacité d'intégrer et de

former des réseaux vasculaires. Nos résultats indiquent que les cellules progénitrices endothéliales formant les structures vasculaires seulement sections viables ventriculaires embryonnaires murins, tandis que le ischémique seulement intégrer ces cellules, ce qui démontre une communication directe avec l'autre.

Les résultats ont montré que l'acétylation des histones peut inhiber la différenciation des cellules progénitrices endothéliales. Les inhibiteurs de désacétylation (VPA, TSA, BuA) gardent la chromatine acétylée dans un état correspondant à un décondensent de forme.

Le niveau des désacétylases des histones a été diminué de manière significative en présence de ces inhibiteurs et le niveau de l'histone H3 acétylée a été augmenté et ces changements ont été en corrélation avec l'expression de marqueurs de différenciation impliqués dans des cellules progénitrices endothéliales. Les données de la biologie moléculaire et de l'immunophénotypage des inhibiteurs de HDAC ont montré que l'abaissement de l'expression du vWF, VEGFR2, eNOS, CD117, CD133, CD144, CXCR4 et Tie-2, alors que l'expression de CD34 et de CD45 reste inchangée montrant que les désacétylases des histones sont impliquées dans la différenciation des cellules endothéliale. Expression VE -cadhérine a été inhibée de manière significative à la fois au niveau de l'ARNm et des protéines. Le mécanisme sous-jacent de l'expression de la VE-cadhérine changement peut s'expliquer par ses facteurs de transcription de type incapacité de HoxC6 pour interagir avec les histones acétylées dans le but d'activer le promoteur de la VE- cadhérine. L'expression des gènes de CXCR4, Tie-2 et VEGFR2 significativement diminué après le traitement avec TSA, le mécanisme mis en jeu est contrôlé par des facteurs de transcription Hox dont l'expression est modulée en présence de ces inhibiteurs. Nos résultats ont montré que, dans l'état acétylé expression de l'HoxD9 dans les cellules progénitrices endothéliales est augmentée à la fois au niveau dugène et de la protéine.

Le processus de néovascularisation est un processus complexe impliquant une série d'étapes interconnectées conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins quand les lésions vasculaires se produisent dans les organes adultes. A la différence de l'angiogenèse, qui est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de certains néovascularisation préexistant, celui ci a lieu par l'intermédiaire des cellules progénitrices endothéliales. Ils sont mobilisées à migrer, proliférer et se différencier au niveau du site cible, sous l'action de cytokines et le micro-environnement. Nos résultats ont montré que l'acétylation inhibe la néovascularisation *in vitro*, agissant dans les processus de prolifération, l'adhésion, la migration et la différenciation

des cellules progénitrices endothéliales. Des cellules progénitrices endothéliales ont montré une diminution significative du niveau d'activité de la télomérase en comparaison avec le témoin, ce qui indique une diminution de la prolifération cellulaire. La motilité cellulaire évaluée en utilisant le " *wound healing-assay* " et par la mesure de l'impédance de la cellule, a montré que les inhibiteurs de HDAC diminuent la motilité cellulaire après 24 heures suivant la stimulation.

En revanche, la chimiotaxie des cellules progénitrices endothéliales ont augmenté après le traitement par les inhibiteurs de HDAC, ce qui peut s'expliquer par le maintien du phénotype de ces cellules progénitrices circulantes. En présence de 3 mM VPA on a montré une stimulation significative de la chimiotaxie des cellules progénitrices endothéliales par l'angiopoïétine, VEGF et SDF. Après la prolifération, la mobilisation, la migration des cellules endothéliales et l'adhésion au site cible, la dernière étape consiste à organiser leur réseau vasculaire. Nous avons poursuivi ce stage en termes d'acétylation. En poussant sur Matrigel en présence d' inhibiteurs de HDAC de cellules progénitrices endothéliales on a montré qu'ils ne peuvent pas former des réseaux vasculaires. Pour confirmer ces résultats, nous avons utilisé une autre matrice à base de collagène. Les résultats indiquent que les cellules progénitrices endothéliales isolées à partir de sang de cordon ombilical ont été capables de survivre et de se conformer à la matrice de collagène. De plus, ces cellules émettent des prolongements interagissent les uns avec les autres et avec la matrice, en formant la structure du réseau. En état acétylé, les cellules progénitrices endothéliales perdent cette capacité, ce qui démontre que l'acétylation inhibe la néovascularisation des cellules endothéliales *in vitro*.

Manipulation de l'activité de l'histone déacétylase pourrait être un outil utile pour générer des populations spécifiques de cellules pour la transplantation. Découvrir les modèles d'acétylation ("*acetylation signature*") impliqués dans la différenciation des cellules souches de différents types ouvre de nouvelles opportunités à l'interface entre la chimie et la biologie des cellules souches, et peuvent fournir des informations précieuses pour améliorer les applications des cellules souches dans l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative.

Nombre de figures dans la première partie -32

Nombre de figures dans le text original (Partie II) – 40

Notes bibliographiques – 251

Articles publiés dans des revues internationales ISI – 4

Articles publiés dans des revues nationales CNCSIS B + 1

Communication orale: 2

Les résumés des communications présentées lors de réunions scientifiques internationales - 11

Les résumés des communications présentées lors de la conférence nationale - 25

Participation à des projets de recherche - 2 national, 1 international.

L'ACADEMIE ROMAINE

Institute de Biologie et Pathologie Cellulaire

"Nicolae Simionescu", Bucarest

THESE DE DOCTORAT

Etudes sur la différenciation des cellules progénitrices en cardiomyocytes afin d'améliorer la transplantation de cellules cardiaques

Directeur de doctorat
Acad. Maya Simionescu

Doctorant
Ana-Maria Rosca

2012

CONTENU

I. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

I.1. Effet de l'ischémie sur les cellules musculaires cardiaques

I.1.1. L'organisation structurelle de la cellule musculaire cardiaque

I.1.2. Métabolisme des cellules musculaires cardiaques

I.1.3. L'ischémie myocardique

I.1.4. Le processus pathologique de la cardiomyopathie ischémique

I.1.5. L'apoptose des cellules muculaires cardiaques

I.1.5.1. La voie extrinsèque de l'apoptose des cardiomyocytes

I.1.5.2. La voie intrinsèque de l'apoptose des cardiomyocytes

I.1.5.3. Rôle des protéines de la famille Bcl-2 dans la régulation de l'apoptose des cardiomyocytes

I.2. Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse

I.2.1. Structure de la moelle osseuse

I.2.2. Les cellules souches mésenchymateuses

I.2.2.1. Le potentiel ostéogénique

I.2.2.2. Potentiel adipogénique

I.2.2.3. Potentiel condrogène

I.2.2.4. La niche des cellules souches mésenchymateuses

I.2.2.4.1. Les constituants cellulaires

I.2.2.4.2. Les constituants solubles

I.2.2.4.3. Les constituants de la matrice extracellulaire

I.2.2.5. Le rôle des cellules souches mésenchymateuses à l'appui de cellules souches hématopoïétiques

I.2.2.6. La migration des cellules souches mésenchymateuses et la réparation tissulaire

I.3. Les mécanismes par lesquels les cellules souches mésenchymateuses contribuent à la réparation du myocarde

I.3.1. La différenciation des cellules souches mésenchymateuses après transplantation dans le myocarde après infarctus

I.3.2. Action des facteurs paracrines libérés par les cellules souches mésenchymateuses dans le myocarde infarctisé

I.4. Cellules souches utilisées dans la thérapie cardiaque

I.4.1. Cellules souches mésenchymateuses

I.4.2. Cellules musculaires squelettique

I.4.3. Cellules progénitrices de la moelle osseuse

I.4.4. Cellules souches embryonnaires

I.4.5. Cellules pluripotentes induites (iPS)

I.4.6. Celulele stem cardiace

I.4.7. Essais cliniques

II CONTRIBUTIONS ORIGINALES

II.1. Altérations moléculaires qui induisent l'apoptose des cardiomyocytes dans l'ischémie-reperfusion

II.1.1. Introduction et objectifs

II.1.2. Matériels et méthodes

II.1.3.Rezultate

II.1.3.1. Caractérisation des cardiomyocytes néonataux
II.1.3.2. L'apoptose des cardiomyocytes induite par l'ischémie
II.1.3.3. Modifications moléculaires des protéines Bcl-2 induites par l'ischémie-reperfusion
II.1.3.4. Effet des antioxydants exogènes sur l'apoptose des cardiomyocytes
II.1.3.5. Modifications des Bcl-2 protéines induites par des oxydants exogènes en CMC
II.1.4. Conclusions et discussion
II.2. Méthodes alternatives pour l'isolement de cellules souches mésenchymateuses
II.2.1. Purification de cellules souches (sur gradient de Percoll)
II.2.1.1. Introduction et objectifs
II.2.1.1. Matériels et méthodes
II.2.1.3. Résultats
II.2.1.3.1. Localisation et quantification des cellules c-kit et Sca-1 positives dans la moelle osseuse de souris
II.2.1.3.2. Séparation des cellules de la moelle osseuse sur gradient de Percoll
II.2.1.3.3. Quantification des cellules progénitrices dans les fractions obtenues après centrifugation de la moelle ossoeuse sur gradient discontinu de Percoll
II.2.1.3.4. Evaluation du potentiel clonogène des cellules progénitrices hématopoïétiques
II.2.1.3.5. Expression de marqueurs de cellules différenciées dans les fractions obtenu après centrifugation
II.2.1.4. Conclusions et discussion
II.2.2. Isolement des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse
II.2.2.1. Introduction et objectifs
II.2.2.2. Matériels et méthodes
II.2.2.3. Résultats et discussion
II.2.2.3.1. Caractérisation phénotypique des cellules
II.2.2.3.2. Caractérisation fonctionnelle des cellules souches mésenchymateuses
II.2.2.4. Conclusions
II.3. Différenciation des cellules souches mésenchymateuses en cardiomyocytes
II.3.1. La différenciation in vitro de cellules souches mésenchymateuses en cardiomyocytes
II.3.1.1. Introduction et objectifs
II.3.1.2. Matériels et méthodes
II.3.1.3. Résultats
II.3.1.3.1. Caractérisation des cellules souches
II.3.1.3.2. L'effet de 5-azacytidine sur la multipotence des cellules souches mésenchymateuses
II.3.1.3.3. La capacité de 5-azacitidine à induire la différenciation miogene des cellules souches mésenchymateuses
II.3.1.4. Conclusions
II.3.2. L'influence de facteurs sécrétés par le myocarde sur la différenciation des cellules stromales mésenchymateusea en cardiomyocytes

II.3.2.1. Introduction et objectifs
II.3.2.2. Matériels et méthodes
II.3.2.3. Résultats
II.3.2.3.1. Capacité de différenciation des cellules stromales de la moelle osseuse
II.3.2.3.2. Techniques de marquage cellulaire
II.3.2.3.3. La différenciation des cellules stromales de la moelle osseuse induite par coculture avec cellules musculaires cardiaques
II.3.2.3.4. La différenciation des cellules stromales de la moelle osseuse induite par coculture avec myocarde fœtale
II.3.2.4. Conclusions

II.4. Mise en évidence des facteurs avec effet paracrin sécrétés par les cellules souches mésenchymateuses dans des conditions normales et hypoxiques

II.4.1. Introduction et objectifs
II.4.2. Matériels et méthodes
II.4.2. Résultats et discussion
II.4.2.1. Conditions d'induire l'apoptose dans les cellules du muscle cardiaque
II.4.2.2. La résistance des cellules souches mésenchymateuses à l'apoptose induite par l'ischémie
II.4.2.3. L'effet des facteurs anti-apoptotiques libérés par les cellules souches mésenchymateuses sur les cardiomyocytes
II.4.2.4. Identification des facteurs avec action cardioprotectrice secrétés par les cellules souches mésenchymateuses cultivées en conditions normales et hypoxiques
II.4.4. Conclusions

III. Résumé de thèse et conclusions générales
IV. Bibliographie
Les articles publiés pendant la préparation de la thèse
Financement de la recherche

MOTS-CLE

Cellules musculaires cardiaques

Apoptose

Ischemie/Reperfusion

Oxydants exogènes

Celulles stem mésenchymateuses

Différentiation adipogène

Différentiation ostéogène

Différentiation condrogène

Différentiation myogène

Hypoxie

Gradient de Percoll

Effet cardioprotecteur

Milieu conditioné

microRNA

RESUME

Introduction - état actuel des connaissances

Les myopathies ischémiques et non ischémiques conduisent a dysfonction du ventricule gauche et, éventuellement, à l'insuffisance cardiaque. Ce dernier diminue la qualité de vie et la durée de vie augmente les coûts médicaux. Tout cela rend l'insuffisance cardiaque peut être l'un des problèmes principaux de santé dans le monde (McMurray et Pfeffer, 2005). Les thérapies actuelles fournissent dans un certain degré la survie et l'amélioration des symptômes, mai elles ne sont pas capable de renverser la condition du tissu cardiaque d'un état malade à un état sain (Kuraitis *et al.*, 2011). Le développement récent du domaine de recherche des cellules souches pourrait fournir un moyen de traiter l'insuffisance cardiaque en remplaçant les tissus endommagés au tissu sain, ce qui augmenterait la qualité de vie et la survie des patients atteints de différentes cardiomyopathies.

Les cellules-souches mésenchymateuses (MSC) de la moelle osseuse ont été intensivement étudiées pour leur capacité de régénération et propriétés immunomodulatrices. Des études sur des modèles animaux ont montré que la thérapie qui utilise MSC améliore la fonction cardiaque après un infarctus du myocarde en diminuant l'apoptose et en produisant de facteurs angiogéniques (Tang et *al.*, 2005). Vu que la capacité de différenciation de MSC en cardiomyocytes (CMC) est très basse et ne peut pas expliquer l'effet bénéfique transitoire observé pendant les études précliniques ou cliniques de transplantation au site d'infarctus (Rose et al., 2008), cet effet a été attribué aux facteurs avec action paracrine de ces cellules (Gnecchi *et al.*, 2008). Les MSC sont capables de libérer des facteurs solubles (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance) qui agissent d'une manière paracrine sur les cellules lésées du myocarde. En plus, récemment il a été montré que les MSC sont capables de communiquer avec les cellules envoisinées par des fragments membranaires circulaires appelés microvézicules. Ainsi, MSC peuvent sécréter diverses composantes solubles, telles que : récepteurs, facteurs de croissance, lipides biologiquement actifs et acides nucléiques (ARNm et micro-ARN) protégés contre l'environnement extracellulaire agressif (Morel *et al.*, 2004, Gatti *et al*. 2011).

Les MSC présentent un certain nombre d'avantages pour la médecine régénérative, tels que: (i) ces cellules peuvent être facilement isolées et multipliées en culture pour obtenir un nombre approprié pour la thérapie cellulaire, (ii) elles ont une faible immunogénicité, ce que les rende aptes à la transplantation allogénique (Dai et al., 2005) et à cause de cela les questions éthiques

adjacentes à d'autres types de cellules-souches utilisées pour la transplantation, telles que les cellules souches embryonnaires, sont évitées (iii).

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été d'étudier certains aspects de l'apoptose de CMC en conditions ischémiques et la différenciation des MSC dérivées de la moelle osseuse de souris adultes en les cellules musculaires cardiaques. Ainsi, pendant toute la durée des études doctorales, les investigations ont été concentrés sur la compréhension des mécanismes par lesquels le muscle cardiaque est endommagé pendant et consécutive l'infarctus du myocarde et de trouver une méthode efficace pour sa réparation. Cette thèse est divisée en deux grandes parties: la première partie présente l'état actuel des connaissances sur le sujet de la thèse, présentée en quatre chapitres, pendant que la deuxième partie présente les contributions originales du doctorant à la connaissance scientifique internationale, qui ont été également organisées en quatre chapitres.

I. Altérations moléculaires conduisant à l'apoptose des cardiomyocytes pendant l'ischémie-reperfusion

À travers du premier chapitre on a essayé de répondre à la question : si l'ischémie ou la reperfusion soit responsable pour l'induction de l'apoptose dans les CMC. La connaissance du stimulus principal responsable de l'induction de l'apoptose dans les CMC est nécessaire afin de trouver un traitement pour ralentir la progression de l'insuffisance cardiaque due à la perte du myocarde contractile. Ainsi, l'objectif de cette première étude a été de déterminer la contribution individuelle de l'ischémie, de la reperfusion et des oxydants exogènes a l'induction de l'apoptose dans la CMC, en établissant la contribution majeure à la progression de l'insuffisance cardiaque dans La première partie des contributions originales a été axée sur l'identification du stimulus principal responsable de l'initialisation de l'apoptose dans le myocarde. Cette information est cruciale pour le développement de thérapies pour la progression de l'insuffisance cardiaque due à la perte de contractilité du myocarde. Les résultats obtenus dans cette première phase du stage de doctorat ont indiqué que le principal inducteur de l'apoptose dans l'ischémie / reperfusion a été la reperfusion plutôt que l'ischémie *per se*. L'étude a montré que les oxydants exogènes apportés de l'environnement lors de la reperfusion sont les principaux déterminants de l'apoptose des CMC. 25-hydroxycholestérol, une composante du LDL oxydé, favorise l'apoptose des CMC par un mécanisme dépendant de la caspase-3, ce qui implique l'augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax (Figure 1), régulée au niveau transcriptionnel, en même temps que

la dégradation post-traductionnelle de la protéine -anti-apoptotique Bcl-2 (figure 2). L'altération de la balance des protéines pro- et anti-apoptotiques a créé des conditions favorables pour lancer le processus d'apoptose, ce qui peut avoir lieu seulement pendant la reperfusion, quand les réserves d'ATP et de glucose sont restaurées. Les résultats de cette étude indiquent que la thérapie antioxydante pourrait jouer un rôle important pour sauver le myocarde viable après un infarctus en empêchant la perte de CMC par mort cellulaire programmée.

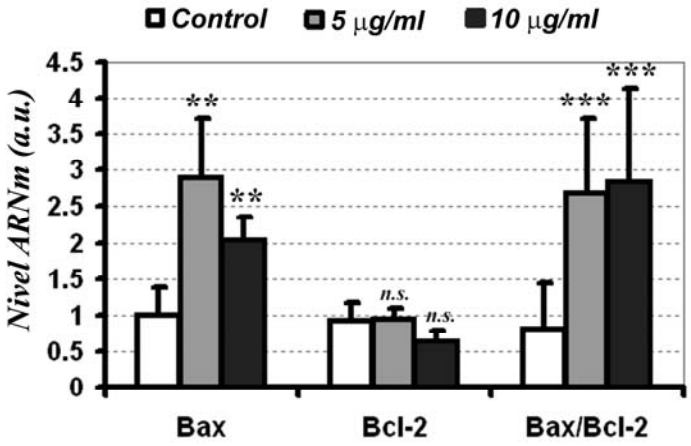


Figure 1: Les changements induits dans l'expression génique des protéines pro- et anti-apoptotiques Bax et Bcl-2 dans les CMC, après 72 heures de traitement avec 25-hydrohycholesterole.

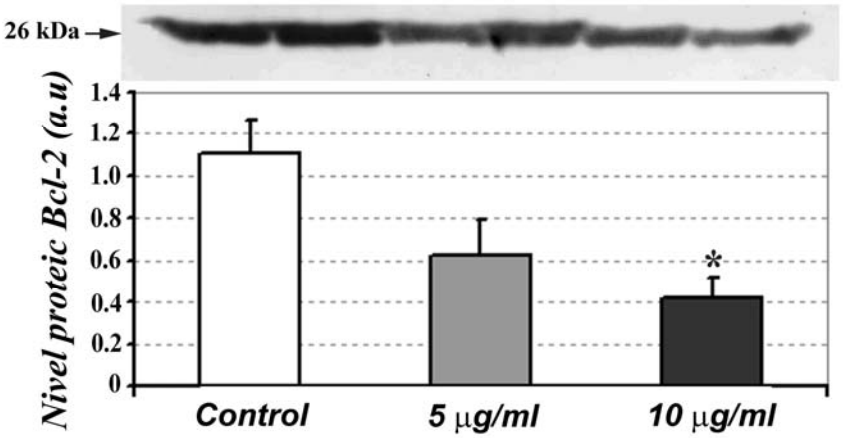


Figure 2: Quantification par Western blot des niveaux d'expression des protéines de la famille Bcl-2 après traitement par 25-hydrohycholesterol.

II. Isolement des cellules souches mésenchymateuses

L'étape suivante a consisté au développement des méthodes d'obtenir des MSC de la moelle osseuse de souris adultes, devant servir à utiliser dans des études de différenciation vers CMC. Cette phase des études doctorales a présenté un intérêt particulier parce que les MSC provenant de la souris sont plus difficiles à isoler et à propager *in vitro* que les cellules humaines ou de rat, à couse de la contamination avec des cellules hématopoïétiques. Pour cette raison, obtenir un MSC cultures à partir de la moelle osseuse de la souris était un défi qui a abouti à l'isolement de ces cellules simultanément par deux méthodes. La culture pure des MSC obtenue a ensuite été caractérisée comme suggéré par la Société internationale de Transplantation Cellulaire.

II.1. L'isolement des cellules souches mésenchymateuses par centrifugation sur gradient de Percoll

Les résultats obtenus ont montré que la centrifugation de la suspension cellulaire provenant de la moelle osseuse sur un gradient discontinu de Percoll entraîne la séparation des cellules en six fractions correspondant aux densités 1,050 1,057, 1,067, 1,070, 1,076, 1,083 et g / ml (figure 3).

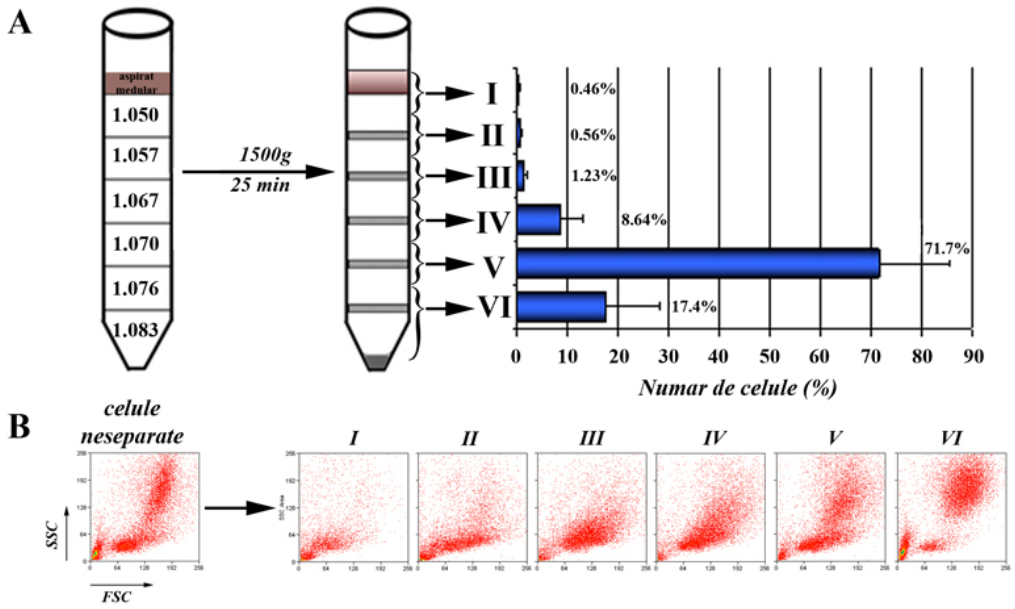


Figure 3: La séparation des cellules de la moelle osseuse en six fractions par centrifugation sur un gradient discontinu de Percoll. (A) Représentation schématique du gradient discontinu de Percoll utilisé pour le fractionnement des cellules et pourcentages correspondants à chaque fraction récupérée après centrifugation. (B) Histogramme de cytométrie de flux

montrant l'hétérogénéité des cellules avant la séparation et la morphologie des cellules dans chaque fraction.

Les cellules progénitrices, caractérisées par l'expression de marqueurs Sca-1 et c-kit ont été trouvés dans les fractions III-V. La fraction IVe a était considérée comme d'intérêt grâce à son contenu d'environ $2x10^6$ cellules souches à partir d'un total de $4.3x10^6$ cellules (figure 4).

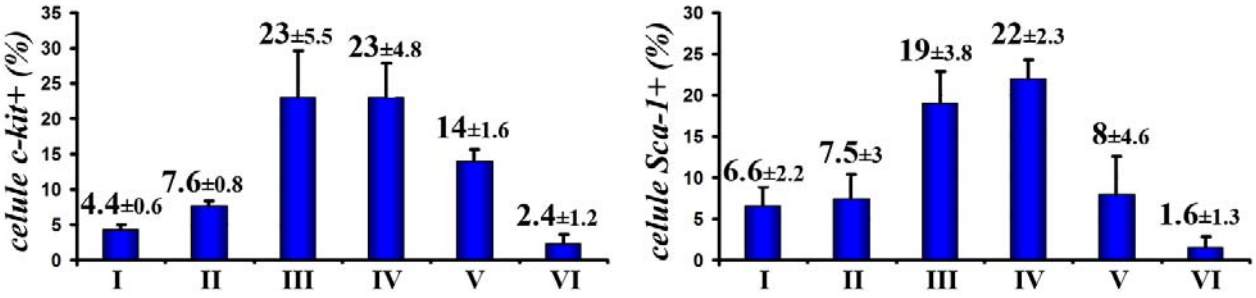


Figure 4: Représentation graphique de la moyenne des pourcentages des cellules c-kit$^+$ et Sca-1$^+$ correspondant a chaque fraction cellulaire, calculée à partir des résultats de trois expérimente différentes.

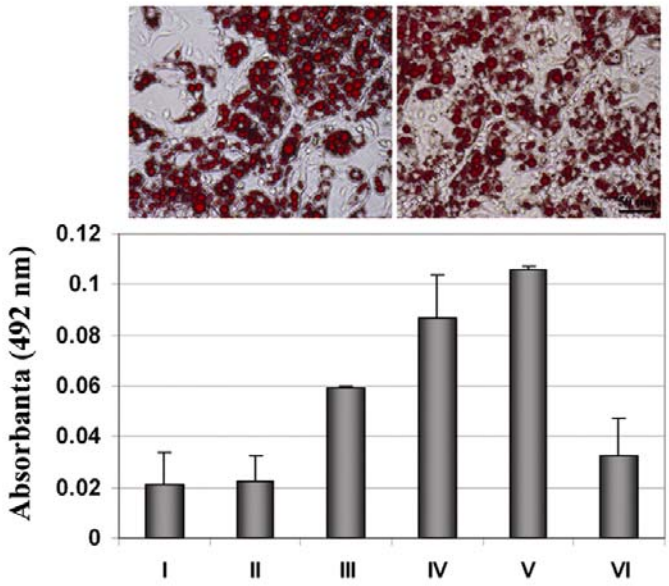


Figure 5: Quantification spectrophotométrique de l'accumulation de lipides dans les six fractions après cultiver les cellules dans un milieu de différenciation adipogénique. En haut se trouvent des images représentatives de fractions III et IV colorées avec Oil Red. La V fraction, bien qu'elle présente une accumulation massive de lipides, n'est pas enrichie de cellules souches, la coloration étant probablement due à la présence des pré-adipocytes à ce niveau.

Bien que la composition cellulaire de cette fraction ait été hétérogène, elle a compris, outre des cellules c-kit et Sca-1 positive, aussi des cellules endothéliales, qui pourraient jouer un rôle important dans le rétablissement du myocarde endommagé après un infarctus, en contribuant à la revascularisation du tissu par l'angiogenèse. En culture, cette fraction a généré des cellules $CD45^-$ /$c\text{-}kit^-$/$Sca\text{-}1^+$ / $PECAM^-$/$VEGFR2^-$/$osteocalcine^-$/colagen II, qui ont généré des adipocytes et des ostéoblastes par incubation dans milieux de différenciation spécifique, en montrant la nature multipotente de ces cellules (figures 5 et 6).

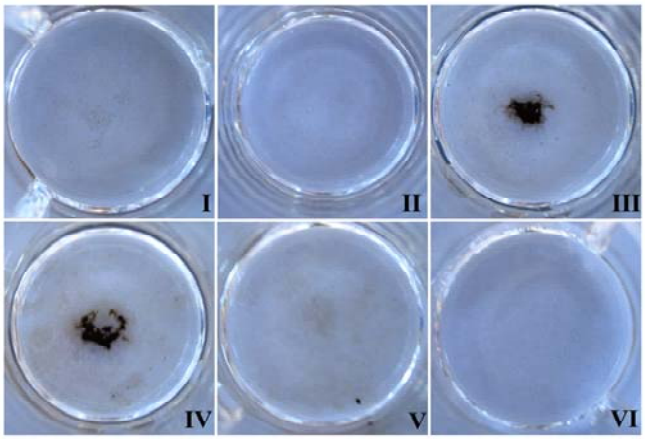


Figure 6: Image en microscopie optique représentant la coloration von Kossa des cellules adhérentes correspondant aux six fractions après deux semaines de culture en milieu de différenciation ostéogénique. On peut observer que les fractions III et IV, mais pas fraction V (qui contienne la majorité des cellules) ont été en mesure de générer des ostéoblastes dans des conditions de culture spécifiques.

II.2. L'isolement de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse hématogène

En parallèle avec la méthode présentée ci-dessus, on a ainsi obtenu une population de cellules souches mésenchymateuses à partir de la de moelle osseuse hématogène par maintenir les cellules adhérentes en culture pendant une période plus longue, d'environ huit semaines. Les cellules dérivées ont formé une culture homogène qui présentait une apparence fibroblast-like et un fort potentiel de prolifération. La caractérisation de cette culture par RT-PCR (figure 7a) a

montré une expression de marqueurs de cellules souches Sca-1 et CD105 (endogline), et l'absence de marqueur c-kit, qui a indiqué une déplétion des cellules souches hématopoïétiques. Une autre caractéristique de ces cellules a été la présence de filaments intermédiaires de vimentine et de nestine. L'expression de ces protéines (figure 7b) a suggéré un rôle possible dans la régénération des tissus vue que la présence de filaments de nestine soit spécifique des cellules jeunes ayant une capacité migratoire.

La caractérisation de ces cellules a été complétée par des études de différenciation en plusieurs types de cellules, comme les adipocytes, ostéoblastes et les chondrocytes. Cela a montré leur caractère multipotent qui a été maintenu inchangé pendant plusieurs passages (figure 8). Cette culture a été utilisée dans des études ultérieures qui ont suivi la différenciation dans un phénotype musculaire, dont les résultats sont présentés au chapitre III de cette thèse.

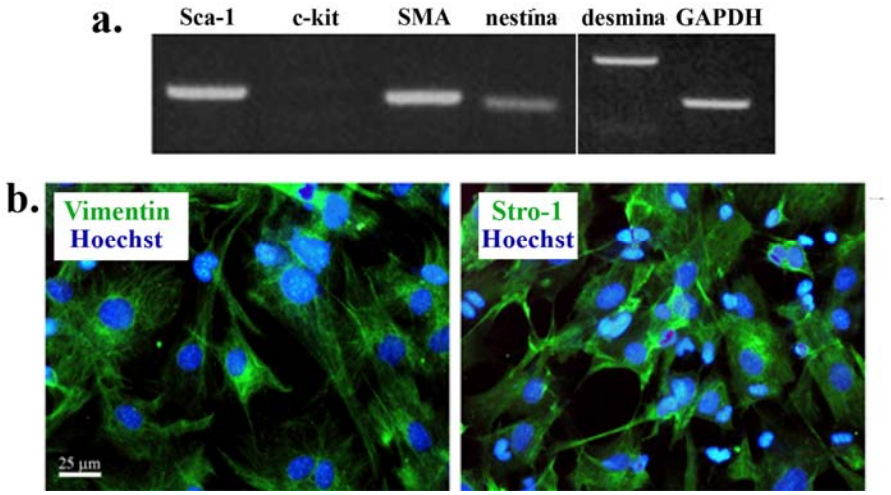


Figure 7: (a) RT-PCR montrant le niveau d'expression de l' ARNm de marqueurs de MSC: Sca-1, l'actine spécifique pour les cellules musculaires lisses (SMA) et la desmine. On peut observer aussi l'absence de l'expression du marqueur de cellules souches hématopoïétiques c-kit (b) Image d' immunocytochimie qui montre la présence des filaments intermédiaires de vimentine et l'expression du marqueur des cellules stromales Stro-1 dans toutes les cellules en culture.

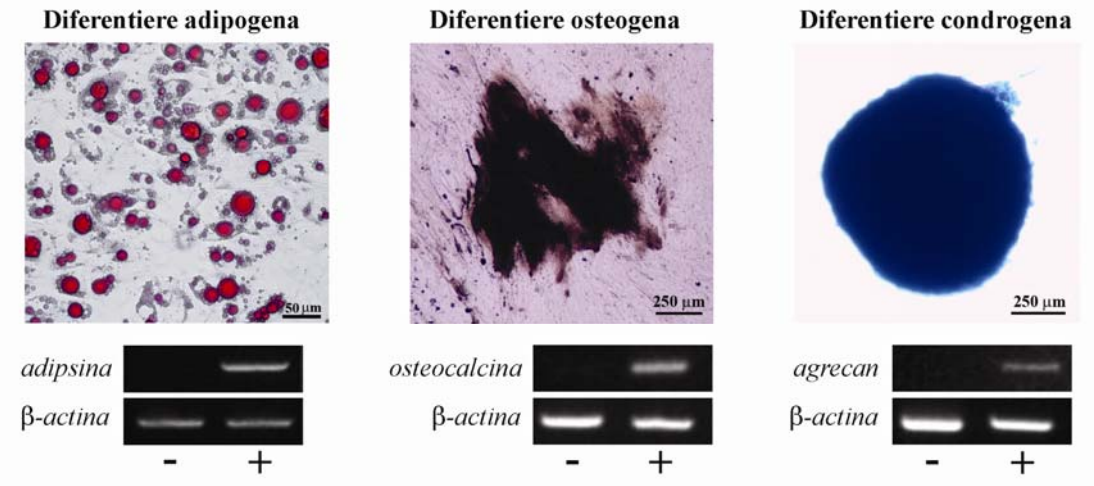


Figure 8: Caractérisation du caractère multipotent des MSC. Sur le côté gauche de l'image on peut observer la différenciation des cellules en adipocytes, mise en évidence par coloration des accumulations de lipides intracytoplasmiques avec Oil Red O et la détermination de l'expression génique de l'adipsine par RT-PCR. Au centre de l'image la différenciation de cellules dans ostéoblastes est présentée. En haut il se voit la coloration von Kossa et ci-dessous l'expression d'ostéocalcine (RT-PCR) est illustré. Sur la droite la coloration au Bleu Alcian des mucopolysaccharides acides cellules spécifiques pour les chondrocytes différenciés et l'expression génique du protéoglycane agrecan dans sont présentés.

III. La différenciation des cellules souches mésenchymateuses en cardiomyocytes

Pour induire la différenciation MSC vers un phénotype cardiaque 5-azacytidine, un composé agissant déméthylation du matériel génétique, connu pour sa capacité à améliorer la différenciation des cellules souches embryonnaires à CMC, a été utilisé.

L'action de la 5-azacytidine sur la propriété des cellules souches de se différencier en lignées cellulaires multiples a été un point d'intérêt de cette thèse. Les résultats ont montré que les cellules traitées avec 5-azacytidine et ont progressivement perdu leur capacité à se différencier en adipocytes et ostéoblastes quand ils ont été incubés dans des conditions de différenciation spécifiques. L'augmentation du potentiel de différenciation des MSC dans chondrocytes après traitement avec 5-azacytidine a été un résultat inattendu. La conclusion de cette étude a été : les MSC conservent leur propriété de différenciation après la première exposition à l'action de la 5-azacytidine, mais elle est progressivement réduite à chaque exposition, en augmentant la capacité de générer des chondrocytes (figure 9).

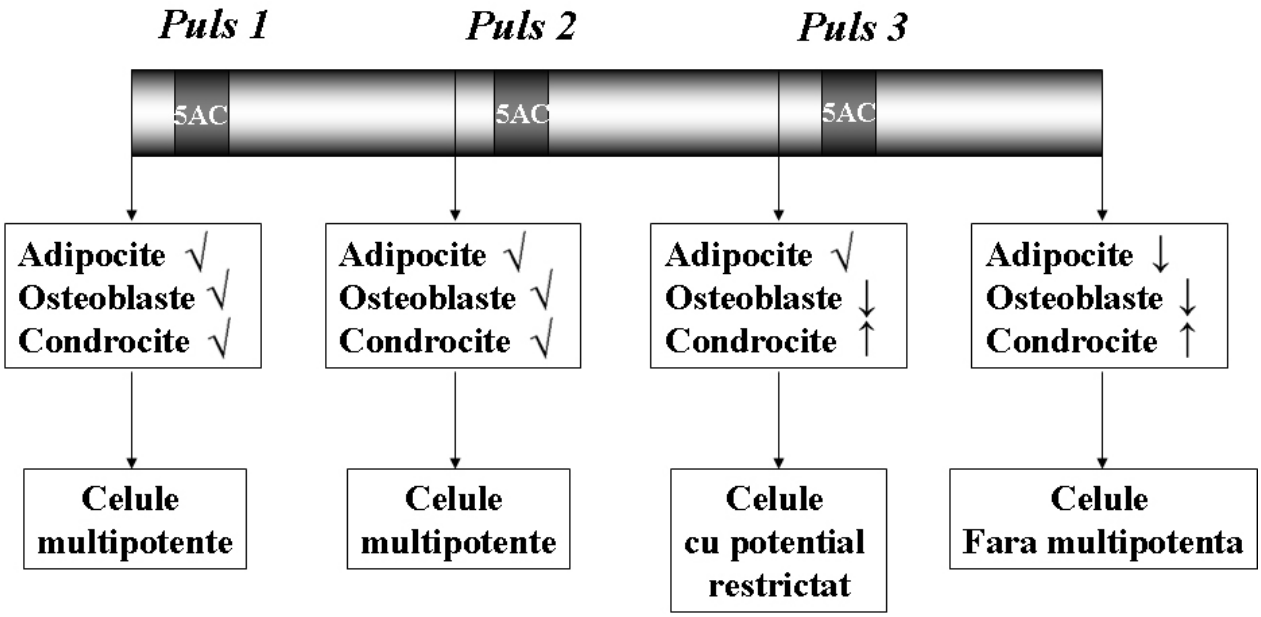


Figure 9: L'effet du traitement avec 5-azacytidine sur la capacité des MSC de différenciation en lignes cellulaires multiples. Cette propriété est devenue plus restrictive après exposition au 5-azacitidine. Après 2 ou 3 traitements avec 5-azacitidine, la capacité de se différencier en chondrocytes a été augmenté de manière significative.

Avec soulignant les modifications du caractère pluripotent des MSC par traitement avec la 5-azacytidine, on a poursuivi la capacité de cet agent chimique à induire la différenciation de ces cellules vers un phénotype musculaire cardiaque. Les figures 10 et 11 montrent que, sauf pour quelques gènes musculaires spécifiques (α-actine cardiaque, canal de calcium du type L), l'expression d'aucune des gènes impliqués dans la différenciation des cellules musculaires cardiaques n'a pas été induite dans les cellules traitées. Cependant, 5-azacytidine a induit l'expression des gènes spécifiques du muscle squelettique, ce qui a permis la différenciation des MSC en myoblasts quand incubées en conditions myogènes spécifiques (figure 12). En conclusion, le traitement avec 5-azacitidine pourrait favoriser la différenciation des MSC en cellules cardiaques, à condition de déterminer les facteurs spécifiques qui pourraient affecter la réalisation de la différenciation en CMC matures et fonctionnelles.

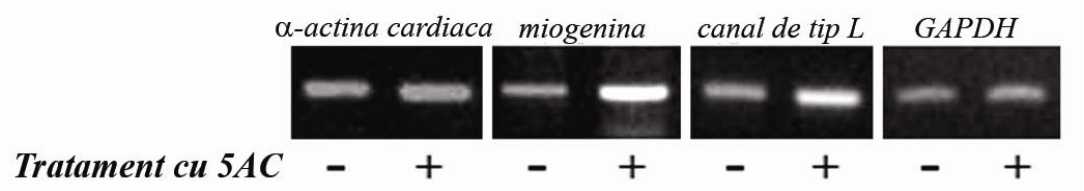


Figure 10: RT-PCR montrant l'expression augmentée des gènes musculaires spécifiques après le traitement avec 5-azacitidine.

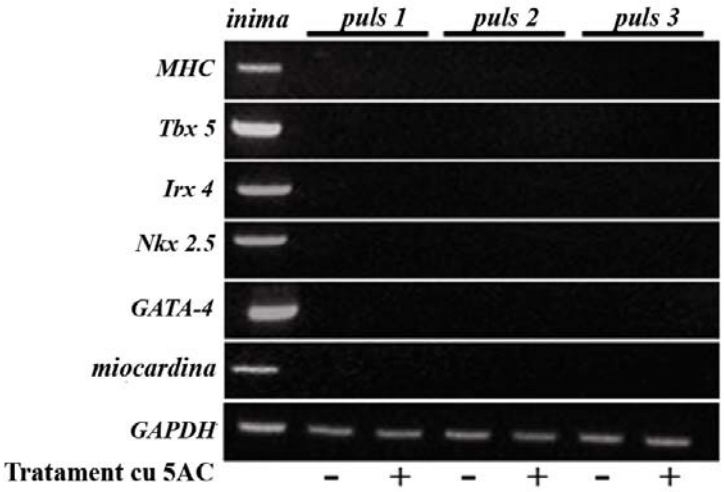


Figure 11: RT-PCR qui montre l'absence de l'expression des facteurs de transcription et d'autres gènes spécifiques du myocarde après le traitement avec 5-azacitidine.

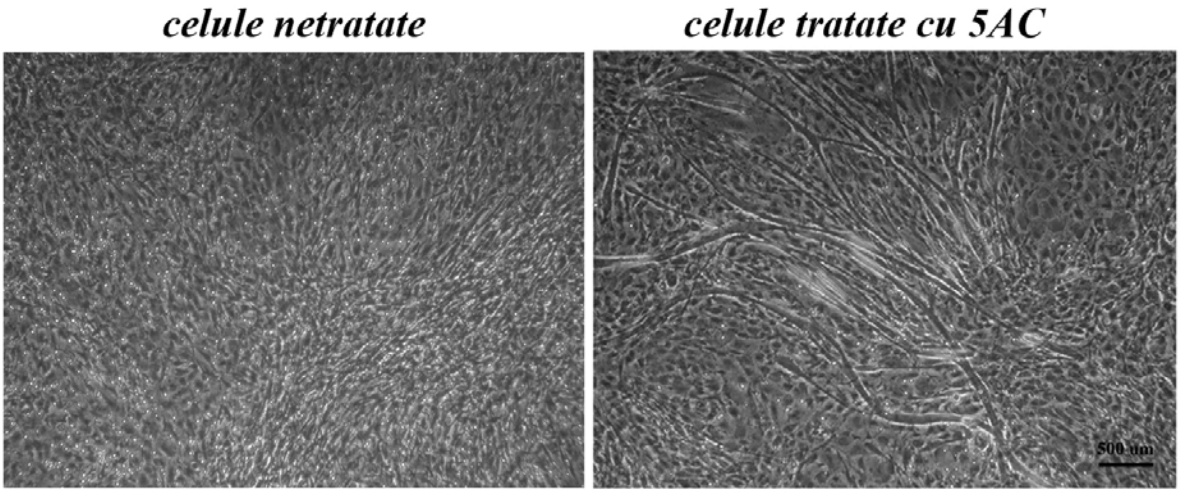
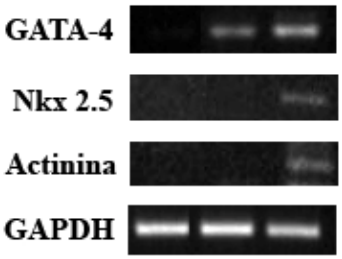


Figure 12: Image de microscopie à contraste de phase qui montre les myotubes formés dans les cultures de MSC traités par 5-azacytidine après privation de sérum.

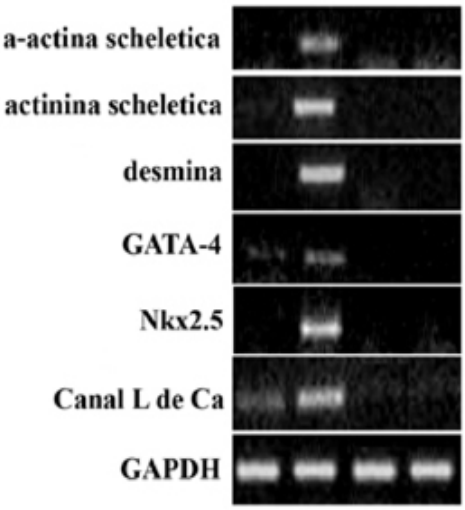
Suite à ces observations, nous avons constaté que le traitement avec 5-azacitidine associée à un contact direct avec les cellules du myocarde peut avoir un effet bénéfique sur la différenciation des cellules stromales en CMC. Ainsi, nous avons suivi les changements dans les cellules stromales de la moelle par contact direct avec les cellules musculaires cardiaques. Les résultats montrent qu'en effet, la cummulation des deux facteurs induisant la differentiation conduit à l'initiation de l'expression des facteurs de transcription cardiaques spécifiques, tels GATA-4 et Nkx2.5 (figure 13), dans les cellules stromales de la moelle osseuse de souris. En plus, l'expression de l-actinine, un indicateur de la différenciation vers un phénotype de muscle strié a été observée.

De plus, les résultats des experiments de coculture dans chambre double, un système qui permet le passage des molécules par les pores d'une membrane semipermeable, ont montré que les facteurs solubles libérés par le myocarde ischémique cumulent avec le traitement avec 5-azacitidine conduit l'augmentation du processus de différenciation des cellules de la moelle osseuse vers un phénotype cardiaque. Ainsi, l'accumulation de l'exposition au 5-azacytidine et de l'action des signaux provenant du myocarde ischémique entraînent l'initiation de la transcription des principaux facteurs impliqués dans la différenciation des cellules musculaires cardiaques tels que: l'actine musculaire, l'actinine, desmine, GATA-4, Nkx2.5 et des canaux de calcium de type L (figure 14). Ainsi, on peut conclure que l'initiation de la différentiation induite par la déméthylation de certains gènes est aidée par l'effet de facteurs solubles cardiaques qui sont en mesure d'achever ce processus.



CSA	+	+	+
CMC	-	+	+
5AC	-	-	+

Figure 13: RT-PCR montrant l'induction de l'expression génique des marqueurs cardiaques dans les cellules traitées avec 5-azacitidine après 1 semaine en culture avec CMC fœtales. On peut observer que l'effet cumulatif de ces deux conditions (traitement avec 5-azacitidine et contact direct entre les cellules stromales et CMC) est supérieur au simple contact entre les deux types cellulaires.



Inima	+	+	-	-
CSA	+	+	+	+
5AC	-	+	-	+

Figure 14: RT-PCR montrant l'induction de l'expression génique des marqueurs des cellules musculaires cardiaques dû à l'effet cumulatif des facteurs induisant la différenciation des cellules stromales de la moelle osseuse dans CMC: 5-azacytidine et facteurs secrétés par le myocarde ischémique.

IV. Mise en évidence des facteurs paracrins sécrétés par les cellules souches mésenchymateuses en conditions normales et hypoxique

Le dernier chapitre de cette thèse a été réalisé dû aux rapports récents de la littérature sur les résultats d'essais cliniques. Ils ont montré que les effets bénéfiques de la greffe de cellules souches dans l'infarctus du myocarde sont transitoires, ce qui suggère un effet paracrin exercé par les cellules transplantées par l'intermède des facteurs angiogéniques et cardioprotecteurs secretés. Ainsi, la dernière partie de cette thèse comprit l'étude de l'effet anti-apoptotique de facteurs solubles libérés par MSC sur les cellules musculaires cardiaque et l'identification des facteurs cardioprotecteurs secretés par les MSC en conditions normales et hypoxiques. Une observation particulièrement importante observée à partir de ces expériences a été la capacité des MSC de s'adapter et survivre en conditions hypoxiques, montrée par la résistance de ces cellules à l'apoptose induite par la hypoxie (Figure 15).

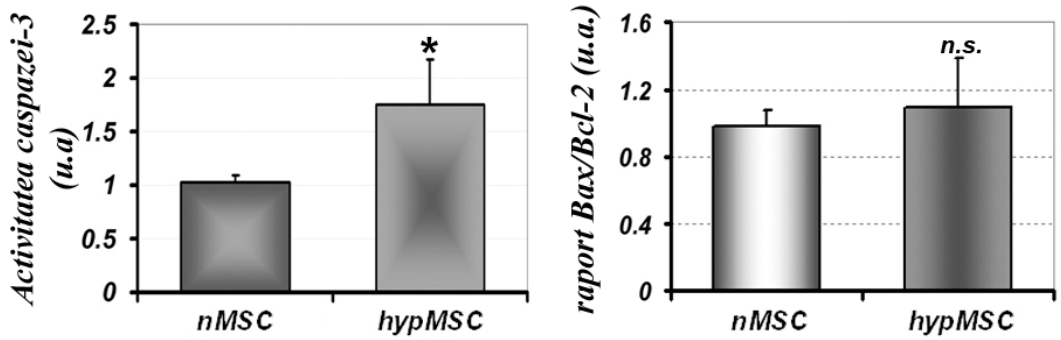


Figure 15: Illustration de la résistance des MSC en conditions ischémiques: le graphique de gauche montre une légère augmentation de l'activité de la caspase-3, tandis que le ratio de l'expression du gène pro-apoptotique Bax et du gène anti-apoptotique Bcl-2, tel que déterminé par PCR quantitative, reste inchangé (graphique de droite).

La résistance des MSC à l'hypoxie induite par apoptose est particulièrement importante pour leur survie dans le myocarde ischémique, où le milieu est dépourvu d'une vascularisation adéquate pour assurer le nécessaire d'oxygène.

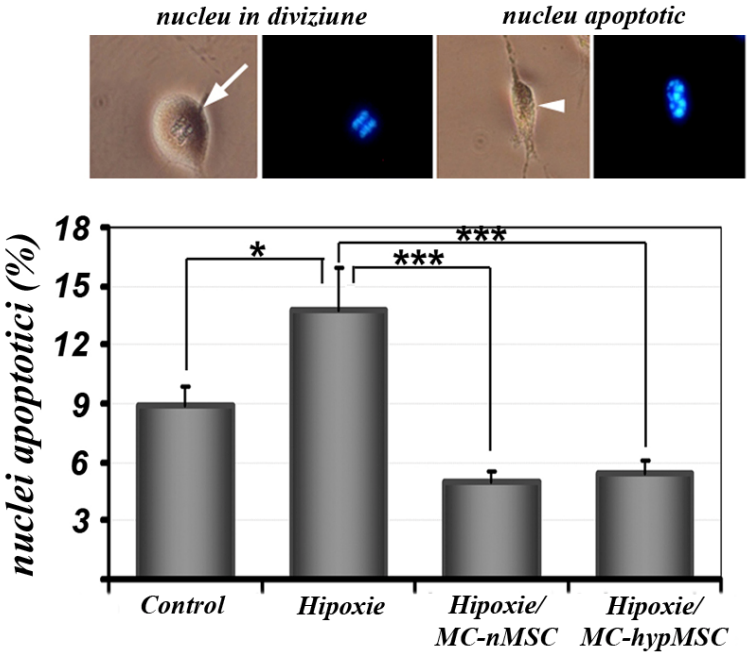


Figure 16: Détermination quantitative de l'apoptose dans les myocytes cardiaques après exposition à l'hypoxie en présence et en absence du milieu conditionné. Le tableau en bas présente les pourcentages des noyaux apoptotiques déterminées par coloration au Hoechst. Au moins 1000 noyaux ont été comptés pour chaque test (, p <0,05, *** p <0,001). On peut observer en haut de cette image des exemples des noyaux apoptotiques, aussi que des noyaux en division.*

L'étude de l'effet du milieu conditionné des MSC sur les CMC incubées en conditions hypoxiques a montré que ces cellules sont capables de secréter des facteurs avec action cardioprotectrice. La supplémentation du milieu des CMC incubées en conditions hypoxiques avec milieu conditioné des MSC a empêché l'induction de l'apoptose (Figure 16). Les résultats ont montré le maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale, ce qui a permis d'éviter l'initiation apoptose. En plus, le milieu des MSC hypoxique a eu des effets similaires à cela récolté à partir des cellules cultivées en atmosphere normoxique (20% O_2), ce qui montre que les MSC conservent leurs propriétés cardioprotectrices pendant l'incubation en conditions hypoxiques. Ce résultat suggère que les MSC transplantées dans le myocarde hypoxique sont capables de contribuer à la survie des CMC affectées par le stress oxydatif et l'hypoxie durant la reperfusion.

L'étude de la composition du milieu conditionné des a montré que ces cellules sont capables de conserver la capacité de synthétiser et libérer certains facteurs cardioprotecteurs tels que certaines cytokines et microARN. Ainsi, on a identifié quelques cytokines sécrétées par le MSC incubés dans des conditions normales, dont quatre ont été trouvés en quantités similaires dans le MSC incubées en hypoxie: TIMP-1, MCP-1, SDF-1α et IL1ra (Figure 17).

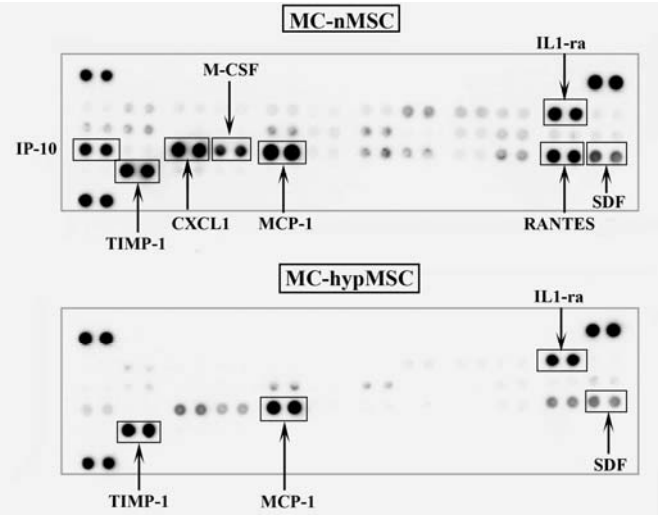


Figure 17: Identification des cytokines sécrétées par MSC en conditions normoxiques (image du haut) et hypoxiques (en bas) par la technique " cytokine array ".

Conformément à la littérature, ces facteurs pourraient être responsables, au moins partiellement, de l'effet cardioprotecteur exercé par la présence des MSC dans le myocarde ischémique, soit grâce à l'action anti-apoptotique ou à a la capacité d'induire le processus d'angiogenèse, important pour rétablir l'approvisionnement du tissus d'oxygène et de nutriments.

Outre ces molécules, il semble que le transfert d'information génétique entre MSC et cellules endommagées est un mécanisme important, qui pourrait être responsable de l'effet réparateur des MSC. Ainsi, on a observé dans le milieu extracellulaire des MSC hypoxiques une augmentation de la quantité des microARN 199a et 1225b, connus pour leur effet anti-apoptotique (Figures 18 et 19).

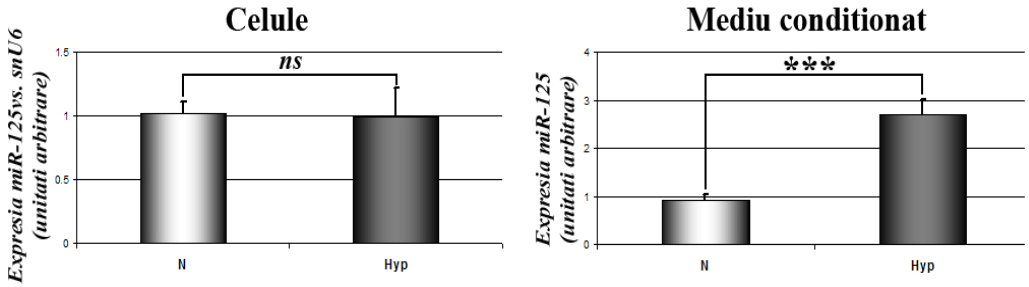


*Figure 18: Quantification du microARN-125 par PCR quantitative dans les MSC incubés en conditions de normoxie et d'hypoxie (graphique de gauche) et le milieu extracellulaire récoltées à partir de cellules maintenues dans les deux conditions (*** p <0,0005).*

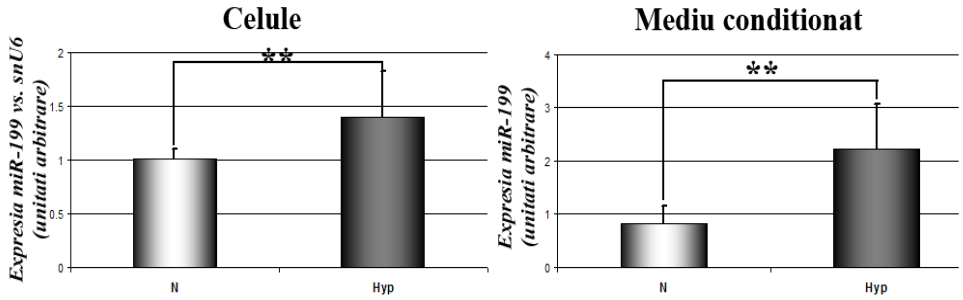


*Figure 19: Quantification du microARN-199 par PCR quantitative dans les MSC incubés en conditions de normoxie et d'hypoxie (graphique de gauche) et le milieu extracellulaire récoltées à partir de cellules maintenues dans les deux conditions (** p<0.005).*

En conclusion, la composition du milieu extracellulaire des MSC consiste en une combinaison de facteurs avec effet soit anti-apoptotiques (TIMP-1, MCP-1, miR-199a, miR-125b), soit inhibiteurs de croissance des fibroblastes (IL1ra) ou angiogéniques (SDF-1α). La présence de ces facteurs cardioprotecteurs dans sécrétion des MSC pourrait être responsable de l'effet anti-apoptotique sur les CMC incubées en conditions hypoxiques observé dans nos expériences.

Conclusions

L'information contenue dans cette thèse a été matérialisée dans des articles publiés en revues internationales à facteur d'impact ISI, des présentations orales ou des affiches aux réunions scientifiques nationales et internationales. Au cours de la préparation de la thèse, les résultats suivants ont été obtenus:

- On a montré que le facteur principal responsable pour l'initialisation de l'apoptose des CMC soumis à l'ischémie est représenté par les oxydants exogenes amenés par la réperfusion au site de la lesion;
- On a établi une méthode pour purifier une population de cellules progénitrices par fractionnement de la moelle osseuse par centrifugation sur gradient discontinu de Percoll ;
- On a obtenu des cultures homogène de MSC, caractérisées conformément aux normes fixées par la Société Internationale de tTransplantation Cellulaire ;
- L'effet de l'action de déméthylation de 5-azacytidine sur la nature pluripotente des MSC a été montré;
- On a démontré l'effet accru de la cumulation de 5-azacytidine et des facteurs secrétés par le myocarde pour l'augmentation de la différenciation des MSC vers un phénotype cardiaque;
- On a démontré l'effet anti-apoptotique des facteurs libérés par MSC normale et hypoxique sur CMC;
- Des facteurs avec action anti-apoptotique, anti-fibrotique et pro-angiogénique ont été identifiés dans le milieu extracellulaire des MSC incubées en conditions normales et hypoxique ; ces facteurs pourraient être responsables de l'action cardioprotectrice de ces cellules.

Bibliographie

1. McMurray JJ. and Pfeffer MA. Heart failure. Lancet 2005; 365: 1877-89.
2. Kuraitis D, Ruel M, Suuronen EJ. Mesenchymal stem cells for cardiovascular regeneration. Cardiovasc Drugs Ther. 2011;25(4):349-62.

3. Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. J Am Coll Cardiol. 2005 Oct 4;46(7):1339-50.

4. Rose RA, Jiang H, Wang X, Helke S, Tsoporis JN, Gong N, Keating SC, Parker TG, Backx PH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro. Stem Cells. 2008;26:2884–92.

5. Gnecchi M, Zhang Z, Ni A and Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. Circ. Res. 2008; 103: 1204-19.

6. Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. Nephrol Dial Transplant. 2011 May;26(5):1474-83.

7. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. Curr. Opin. Hematol. 2004;11(3):156-64.

8. Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. Circulation 2005; 112: 214-23.

Școala de studii avansate a
Academiei Române

Institutul de Biologie și Patologie
Celulară „Nicolae Simionescu”

ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ
„NICOLAE SIMIONESCU”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

cu titlul

Mecanisme epigenetice implicate în instalarea stresului oxidativ și inflamator în ateroscleroză

Susținută în data de 04.09.2020,

Aula George Emil Palade a Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

Coordonator ştiinţific:
Acad. MAYA SIMIONESCU

Doctorand:
MIHAELA LOREDANA VLAD

Bucureşti
2020

CUPRINS

Introducere şi obiective 6

LISTA DE ABREVIERI **Error! Bookmark not defined.**

PARTEA I **Error! Bookmark not defined.**

STADIUL ACTUAL AL CUNOŞTINŢELOR PRIVIND PROCESUL INFLAMATOR ASOCIAT BOLII ATEROSCLEROTICE **Error! Bookmark not defined.**

I. Inflamaţia în stadiile dezvoltării plăcii aterosclerotice **Error! Bookmark not defined.**

I.1. Stadiul I. Activarea celulelor endoteliale **Error! Bookmark not defined.**

I.2. Stadiul II. Disfuncţia celulelor endoteliale **Error! Bookmark not defined.**

I.3. Recrutarea celulelor imune din sânge **Error! Bookmark not defined.**

I.3.1. Monocitele/Macrofagele **Error! Bookmark not defined.**

I.3.1.1. Polarizarea macrofagelor **Error! Bookmark not defined.**

I.3.2. Limfocitele T **Error! Bookmark not defined.**

I.3.3. Celulele dendritice **Error! Bookmark not defined.**

I.3.4. Plachetele sangvine **Error! Bookmark not defined.**

I.3.5. Celule polimorfonucleare (PMN) **Error! Bookmark not defined.**

I.3.6. Mastocitele **Error! Bookmark not defined.**

I.3.7. Celulele B **Error! Bookmark not defined.**

I.3.8. Celulele musculare netede (CMN) **Error! Bookmark not defined.**

I.4. Stadiul IV. Formarea plăcii fibroase **Error! Bookmark not defined.**

I.5. Stadiul V. Placa fibro-calcifiată **Error! Bookmark not defined.**

I.6. Stadiul VI. Placa instabilă: ruptură şi tromboză **Error! Bookmark not defined.**

II. Stresul oxidativ şi macrofagele **Error! Bookmark not defined.**

II.1. NADPH oxidaza 1 (Nox1) **Error! Bookmark not defined.**

II.2. NADPH oxidaza 2 (Nox2) **Error! Bookmark not defined.**

II.3. NADPH oxidaza 4 (Nox4) **Error! Bookmark not defined.**

II.4. NADPH oxidaza 5 (Nox5) **Error! Bookmark not defined.**

III. Epigenetica și bolile cardiovasculare **Error! Bookmark not defined.**

III.1. Procesele de remodelare ale cromatinei **Error! Bookmark not defined.**

III.2. Codul epigenetic al histonelor **Error! Bookmark not defined.**

III.3. Variante histonice **Error! Bookmark not defined.**

III.4. Acetilarea/deacetilarea histonelor **Error! Bookmark not defined.**

III.4.1. Inhibitori HAT (HATi) **Error! Bookmark not defined.**

III.4.2. Inhibitori HDAC **Error! Bookmark not defined.**

III.5. Metilarea/demetilarea **Error! Bookmark not defined.**

III.5.1. Inhibitori DNMT **Error! Bookmark not defined.**

III.6. Mecanisme bazate pe modificări ale ARN **Error! Bookmark not defined.**

PARTEA II **Error! Bookmark not defined.**

CONTRIBUŢII ORIGINALE **Error! Bookmark not defined.**

II. Căile dependente de histonacetil transferaze mediază creşterea NADPH oxidazei 5 în macrofagele umane în condiţii inflamatorii: un potenţial mecanism al supra-producţiei de specii reactive de oxigen în ateroscleroză **Error! Bookmark not defined.**

II.1. Introducere şi obiective **Error! Bookmark not defined.**

II.2. Materiale şi metode **Error! Bookmark not defined.**

II.2.1. Materiale **Error! Bookmark not defined.**

II.2.2. Ţesuturi non-aterosclerotice şi aterosclerotice umane **Error! Bookmark not defined.**

II.2.3. Culturi celulare şi design experimental **Error! Bookmark not defined.**

II.2.4. Imunohistochimie (IHC) şi Imunofluorescenţă (IF) **Error! Bookmark not defined.**

II.2.5. Evaluarea depozitelor lipidice din leziunile aterosclerotice **Error! Bookmark not defined.**

II.2.6. Real-time PCR **Error! Bookmark not defined.**

II.2.7. Analiza Western Blot **Error! Bookmark not defined.**

II.2.8. Transfecţii tranziente şi tehnica genei raportor **Error! Bookmark not defined.**

II.2.9. Imunoprecipitarea cromatinei (ChIP) **Error! Bookmark not defined.**

II.2.10. Analiza statistică **Error! Bookmark not defined.**

II.3. Rezultate **Error! Bookmark not defined.**

II.3.1. Nivelele proteice ale p300, HAT1 şi H3K27ac sunt induse în arterele carotide umane în ateroscleroză **Error! Bookmark not defined.**

II.3.2. Nivelele proteice ale p300, HAT1, H3K27ac şi H3K9ac sunt prezente în zonele abundente în Mac în arterele carotide umane aterosclerotice **Error! Bookmark not defined.**

II.3.3. LPS induce modificări epigenetice în Mac umane observate prin creşterea nivelelor histonelor acetilate **Error! Bookmark not defined.**

II.3.4. Izoformele HAT controlează nivelele genice şi proteice ale Nox5 induse de către LPS în Mac **Error! Bookmark not defined.**

II.3.5. Supraexprimarea tranzientă a p300 sau HAT1 a reglat pozitiv activitatea promotorului Nox5 în Mac **Error! Bookmark not defined.**

II.3.6. LPS induce recrutarea proteinelor p300 şi HAT1 şi favorizează acetilarea histonelor la situsurile transcripţional active la nivelul promotorului genei Nox5 în Mac umane **Error! Bookmark not defined.**

II.4. Discuţii **Error! Bookmark not defined.**

III. Inhibarea farmacologică a histon dezacetilazelor reduce exprimarea NADPH oxidazelor, stresul oxidativ şi dezvoltarea leziunilor aterosclerotice în şoarecii hipercolesterolemici apolipoprotein E- deficienţi; potenţiale implicaţii în ateroscleroză **Error! Bookmark not defined.**

III.1. Introducere **Error! Bookmark not defined.**

III.2. Materiale şi metode **Error! Bookmark not defined.**

III.2.1. Materiale **Error! Bookmark not defined.**

III.2.2. Prelevarea probelor umane non-aterosclerotice şi probe de ţesut aterosclerotic **Error! Bookmark not defined.**

III.2.3. Design-ul experimental al modelelor aterosclerotice *in vivo* şi strategia farmacologică **Error! Bookmark not defined.**

III.2.4. Design-ul experimental al culturilor celulare **Error! Bookmark not defined.**

III.2.5. Măsurarea nivelelor plasmatice de colesterol total, LDL-colesterol şi trigliceride în şoareci **Error! Bookmark not defined.**

III.2.6. Reacţia de polimerizare în lanţ în timp real (Real Time-PCR) **Error! Bookmark not defined.**

III.2.7. Tehnica Western Blot **Error! Bookmark not defined.**

III.2.8. Măsurarea producţiei SRO **Error! Bookmark not defined.**

III.2.9. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) **Error! Bookmark not defined.**

III.2.10. Analiza statistică **Error! Bookmark not defined.**

III.3. Rezultate **Error! Bookmark not defined.**

III.3.1. Nivelele proteice ale HDAC clasa I, IIa şi IV sunt crescute în arterele umane carotide aterosclerotice **Error! Bookmark not defined.**

III.3.2. Inhibarea HDAC nu are efect asupra greutăţii corporale sau a nivelelor plasmatice ale colesterolului total, LDL-colesterol, HDL-colesterol şi trigliceride în şoarecii hipercolesterolemici ApoE-/- **Error! Bookmark not defined.**

III.3.3. Subtipurile clasei HDAC I, IIa şi IV sunt crescute în aorta şoarecilor hipercolesterolemici ApoE-/- **Error! Bookmark not defined.**

III.3.4. SAHA reduce semnificativ leziunile aterosclerotice în aorta şoarecilor hipercolesterolemici ApoE-/- **Error! Bookmark not defined.**

III.3.5. SAHA induce scăderea nivelelor proteice ale CD68 şi CD45 în aorta aterosclerotică a şoarecilor ApoE-/- **Error! Bookmark not defined.**

III.3.6. SAHA induce scăderea nivelelor proteice Nox1 şi Nox4 în aortele aterosclerotice ale şoarecilor ApoE-/- **Error! Bookmark not defined.**

III.3.7. Inhibitorul SAHA reduce SRO produse de NADPH oxidaze în aorta şoarecilor ApoE-/- **Error! Bookmark not defined.**

III.3.8. SAHA reduce formarea produşilor 4-HNE în aorta aterosclerotică a şoarecilor ApoE-/- **Error! Bookmark not defined.**

III.3.9. SAHA reduce markerii inflamatori în aorta aterosclerotică a şoarecilor ApoE-/- **Error! Bookmark not defined.**

III.3.10. Modularea HDAC induce creşteri semnificative ale ARNm pentru TNFα şi ale proteinelor secretate în Mac M1 în cultură **Error! Bookmark not defined.**

III.3.11. Inhibarea farmacologică a HDAC de către SAHA duce la scăderea exprimării genice Nox-urilor în Mac M1-like **Error! Bookmark not defined.**

III.4. Discuţii **Error! Bookmark not defined.**

Concluzii generale **Error! Bookmark not defined.**

Bibliografie 18

Lista lucrărilor publicate **Error! Bookmark not defined.**

Lucrări publicate în reviste internaţionale cotate ISI 11

Articole în pregătire 11

Prezentări orale 12

Lista posterelor prezentate la manifestări ştiinţifice 12

Premii 15

Granturi 16

REZUMAT

Cuvinte cheie: Ateroscleroza, Epigenetică, Specii reactive de oxigen, Boli cardiovasculare, Acetilare, HAT, HDAC, NADPH oxidaze

Număr total de pagini – 117

Număr de figuri în partea de ”Stadiul actual de cunoștințe” - 15

Număr de figuri în partea de ” Contribuții originale”- 23

Număr de tabele - 5

Indicații bibliografice – 119

Lucrări publicate în reviste internaționale indexate ISI – 4 (1 autor principal)

Brevete naționale – 0

Rezumate publicate în reviste indexate ISI – 8

Lucrări în pregătire – 2

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – 2 (1 autor principal)

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale – 14 (4 autor principal)

Postere prezentate la manifestări științifice naționale – 16 (5 autor principal)

Cursuri și specializări - 1

Premii naționale – 4

Burse obținute pe durata programului doctoral – 1

Participarea la proiecte de cercetare internaționale/naționale – 8

Introducere şi obiective

Bolile cardiovasculare reprezintă principala cauză de mortalitate în ţările dezvoltate, inclusiv în România (60%). Ateroscleroza este o boală complexă, multifactorială şi multigenică caracterizată prin îngroşarea şi rigidizarea pereţilor arteriali - determinând îngustarea progresivă a lumenului vascular. Acesta reprezintă un factor determinant al bolilor coronariene şi cerebrovasculare. Ateroscleroza afectează primar: a) arterele elastice (aorta, carotida, iliaca); b) arterele musculare medii şi mari (coronare, cerebrale, poplitee). Cei mai întâlniți factori de risc ai aterosclerozei sunt neinfluenţabili: vârsta avansată, sexul, predispoziţia genetică şi influenţabili: dislipidemii, creşterea LDL (lipoproteine de densitate scăzută), reducerea HDL (lipoproteine de densitate crescută), fumatul, hipertensiunea arterială, diabetul zaharat, obezitatea, sedentarismul, factori psihosociali (Libby, 2002). Deşi toată suprafaţa vaselor de sânge este expusă la factorii de risc, leziunile aterosclerotice apar cu precadere în anumite zone particulare ale arborelui vascular: peretele interior al bifurcaţiilor vasculare, curburile arteriale şi valvele aortice (Simionescu et al, 1986).

Terapia primară a aterosclerozei include medicamente care scad biosinteza endogenă a colesterolului, de exemplu inhibitori ai 3-hidroxi-3metilglutaril-Coenzima A reductaza (statine). Insă aproximativ 50% dintre pacienţi dezvoltă leziuni aterosclerotice în absenţa hipercolesterolemiei. Folosirea statinelor previne complicaţiile bolilor coronariene acute prin stabilizarea plăcii aterosclerotic, nu prin reducerea dimensiunilor acesteia (Aikawa şi Libby, 2004). Până în prezent abordările terapeutice sunt limitate la factori de risc, ţintind cu predilecţie hipercolesterolemia şi hipertensiunea, însă eficacitatea maximă a acestor strategii în studiile clinice a fost de 30-40% (Soto et al, 2012). Prin urmare există o nevoie de a proiecta terapii specifice care să vizeze mecanismele patologice de formare şi dezvoltare a ateroamelor.

În procesul formării plăcilor aterosclerotice un rol important îl au macrofagele (Mac). Acestea sunt derivate din monocite şi sunt celule versatile care îşi modifică fenotipul ca răspuns la factorii existenţi în micromediul plăcii. Mac provin din măduva osoasă hematogenă şi trec prin diferite stadii, de la celula stem pluripotentă-monoblast-promonocit-monocit circulant. Disfuncţia endoteliului cauzată de particulele de LDL transcitate şi acumulate în subendoteliu determină expresia crescuta de MCP-1 ceea ce va conduce la diapedeza monocitelor prin joncţiunile celulelor endoteliale. Acestea se vor diferenţia în Mac activate, vor acumula lipide şi se vor transforma în celule spumoase. Răspunsul inflamator crescut va fi menţinut prin secreţia de molecule pro-inflamatorii şi prin producerea de specii reactive de oxigen (SRO). De asemenea, Mac apoptotice sunt responsabile de formarea centrului necrotic şi de progresia bolii. Datorită rolului important pe care macrofagele îl au în diferitele etape de formare a plăcii aterosclerotice acestea reprezintă ţinte atractive pentru dezvoltarea de terapii.

Studiile recente indică rolul determinant al mecanismelor epigenetice în modularea fenotipului Mac în ateroscleroză. Enzimele histon acetil transferaze (HAT) catalizează acetilarea resturilor de lizină din regiunea amino-terminală a histonelor nucleozomale. În urma acestui proces are loc decondensarea cromatinei, care facilitează accesul factorilor de transcriere la elementele lor de consens din secvenţa ADN şi implicit activarea expresiei genice. Acetilarea histonelor este asociată cu hipertrofia miocitelor, apoptoză, stres oxidativ, remodelare cardiacă, aritmie, insuficienţă cardiacă, hipertensiune şi inflamaţie (referinta).

Scopul acestei teze de doctorat îl constituie identificarea de noi mecanisme moleculare de natură epigenetică în macrofage, în vederea dezvoltării unor noi abordări terapeutice anti-inflamatorii şi anti-oxidante în ateroscleroză.

Ipoteza care a determinat acest studiu o reprezintă faptul că dezechilibrul mecanismelor epigenetice implicate în acetilarea histonelor determină alterarea exprimării unor gene cu rol important în modularea funcţiei macrofagelor pro-inflamatorii (tip M1) şi respectiv anti-inflamatorii (tip M2) în ateroscleroză.

În prima parte a tezei vor fi discutate aspecte actuale referitoare la procesul inflamator asociat aterosclerozei, implicarea inflamaţiei şi a Mac în toate stadiile de dezvoltare a ateroamelor şi a mecanismelor epigenetice, în mod special în ceea ce priveşte acetilarea şi dezacetilarea, mecanisme ce intervin în procesul de formare a plăcilor aterosclerotice.

Partea originală a tezei se refera la : (1) Analiza impactului condiţiilor aterogene asupra sistemului acetilării/dezacetilării histonelor: HAT şi HDAC; (2) Investigarea implicării HAT şi HDAC în instalarea stresului oxidativ şi inflamator la nivelul macrofagelor polarizate în ateroscleroză; (3) Determinarea potenţialului unor compuşi farmacologici direcționaţi către HAT/HDAC în scopul de a reduce formarea plăcilor aterosclerotice la şoarecii ApoE -/-.

Numeroase studii arată că în afară de factorii genetici, mecanismele epigenetice care traduc efectele interacţiilor gene-(micro)mediu contribuie la ateroscleroză prin reglarea exprimării unor gene foarte importante asociate cu inflamaţia, sinteza de matrice extracelulară, proliferarea celulelor şi diferenţiere (Khyzha et al, 2017; Zhang et al, 2018). Stresul oxidativ este un reglator important al numeroaselor procese patologice care duc la formarea plăcilor de aterom. Cu toate acestea, implicarea mecanismelor epigenetice în medierea supraexprimării de SRO şi stres oxidativ în ateroscleroză nu este încă definită (Kietzmann et al, 2017). În acest studiu ne-am concentrat atenţia asupra mecanismelor dependente de HAT implicate în modularea exprimării Nox5, un membru al familiei Nox identificat şi caracterizat în Mon şi Mac umane care contribuie la supraexprimarea SRO şi a stresului oxidativ în ateroscleroză (Manea et al, 2015).

Studii recente indică rolul SRO produse de Nox5 în etiologia bolilor cardiovasculare (BCV), însă mecanismele precise care guvernează inducerea Nox5 nu sunt pe deplin cunoscute (Jha et al, 2017). De aceea, înţelegerea căilor moleculare ale reglării genei Nox5 reprezintă un pas necesar pentru dezvoltarea de terapii avansate anti-stres oxidativ care să reducă semnificativ evenimentele cardiovasculare asociate cu destabilizarea plăcii aterosclerotice vulnerabile (ex. accident cerebral vascular, infarct miocardic, moarte subită). Astfel, a fost emisă ipoteza că nivelul crescut al Nox5 poate fi mediat parţial de modificările topologiei cromatinei. Pentru a aborda această problemă a fost realizat un design experimental folosind probe umane non- şi aterosclerotice obţinute ca materiale reziduale de la pacienţi care au suferit operaţii de endarterectomie şi Mac umane în cultură.

Rezultatele originale obţinute în această teză demonstrează că:

1. Nivelele proteice corespunzătoare p300, HAT1, H3K27ac şi Nox5 sunt induse în arterele carotide aterosclerotice umane şi sunt abundente în zona capului fibros şi a miezului lipidic aterosclerotic care exprimă markerii pan-Mac.

2. Stimularea Mac umane cu LPS induce modificări epigenetice observate prin creşterea nivelului HAT1 şi a acetilării histonelor (H3K27ac, H3K9ac).

3. Inhibarea farmacologică a HAT reduce exprimarea genică şi proteică în Mac stimulate cu LPS; supraexprimarea p300 sau HAT1 induce activarea transcrierii genei Nox5.

4. Recrutarea proteinelor p300 şi HAT1 este crescută la nivelul promotorului genei Nox5 în Mac umane tratate cu LPS.

5. HDAC clasa I (HDAC1, HDAC2, HDAC3), clasa IIa (HDAC4), clasa IIb (HDAC6) şi HDAC IV (HDAC11) sunt crescute în arterele carotide aterosclerotice umane şi în aortele hipercolesterolemice ale şoarecilor ApoE-/.

6. Inhibarea farmacologică a HDAC de către SAHA reduce semnificativ dezvoltarea aterosclerozei şi a markerilor infiltrării celulelor imune în aortele şoarecilor ApoE-/-.

7. Căile de semnalizare dependente de HDAC mediază inducţia exprimării Nox1 şi Nox4 în aortele şoarecilor ApoE-/-.

8. Tratamentul cu SAHA induce scăderea proteinelor NOS2 şi MMP9 din aorta, contribuitori majori ai inflamaţiei vasculare şi remodelării în ateroscleroză.

9. Subtipurile HDAC clasa I, IIa, IIb şi IV precum şi izoformele Nox1, Nox2 şi Nox4 sunt semnificativ crescute în Mac de şoarece pro-inflamatorii M1 *in vitro*.

10. Inhibarea farmacologică a HDAC (de către SAHA) reduce exprimarea nivelelor Nox1, Nox2, Nox4 şi TNFα în Mac de şoarece M1 in cultură.

În ansamblu, datele acestei teze de doctorat întăresc convingerea că p300 are un rol important în medierea inducerii exprimării lui Nox5 în Mac, în condiţii inflamatorii şi furnizează noi date care creează o legătură între mecanismele modificate epigenetic şi supraproducţia de SRO cauzate de Nox5 în ateroscleroză. Ţinând cont de faptul că stresul oxidativ este un factor incriminat în ateroscleroză, ţintirea farmacologică a mecanismelor epigenetice ale căilor care controlează exprimarea Nox5 poate să fie o strategie terapeutică eficientă în tratarea acestei boli.

Interesant, rezultatele noastre furnizează dovezi că în contextul inducerii diferitelor izoforme HDAC, inhibitorul pan-HDAC SAHA prezintă efecte anti-aterosclerotice similare în

şoareci, comparabile cu studiile precedente care subliniau faptul că ablaţia sistemică sau specifică unei singure izoforme HDAC încetineşte ateroscleroza. De aceea, existenţa compensatorie sau a unor mecanisme reglatorii redundante în sistemul HDAC, precum şi a unei reţele complexe între subtipurile HDAC şi celule/factori de transcriere specifici genelor rămâne o problemă deschisă. În acest context, utilizarea inhibitorilor pan- sau a celor specifici HDAC în ateroscleroză este încă disputată şi necesită studii aprofundate. Colectiv, principalele descoperiri ale acestui studiu indică faptul că în ateroscleroză inhibarea farmacologică a creşterii HDAC reduce exprimarea crescută a subtipurilor Nox în aortă şi deasemenea şi a stresului oxidativ, duce la scăderea markerilor inflamatori şi a formării leziunilor aterosclerotice în şoareci. Deoarece multiplele subtipuri HDAC sunt deasemenea crescute în ateroscleroza umană, intervenţiile farmacologice orientate către HDAC ar putea fi o nouă strategie terapeutică eficientă în ateroscleroză.

Colectiv, principalele descoperiri ale acestui studiu indică faptul că în ateroscleroză inhibarea farmacologică a creşterii HDAC reduce exprimarea crescută a subtipurilor Nox în aortă şi de asemenea şi a stresului oxidativ, duce la scăderea markerilor inflamatori şi a formării leziunilor aterosclerotice în şoareci. Deoarece multiplele subtipuri HDAC sunt de asemenea crescute în ateroscleroza umană, intervenţiile farmacologice orientate către HDAC ar putea fi o nouă strategie terapeutică eficientă în ateroscleroză.

Lucrări publicate în reviste internaţionale cotate ISI

1. Manea SA, **Vlad ML**, Fenyo IM, Lazar AG, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A (2020) Pharmacological inhibition of histone deacetylase reduces NADPH oxidase expression, oxidative stress and the progression of atherosclerotic lesions in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice; potential implications for human atherosclerosis. *Redox Biology* 101338 ***Factor de impact 9.99***

2. Antonescu ML, Manea SA, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A (2019) Histone acetyltransferase-dependent pathways mediate NADPH oxidase 5 up-regulation in human macrophages under inflammatory conditions: a potential mechanism of reactive oxygen species overproduction in atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev* 2:3201062. ***Factor de impact: 5.08***

3. Manea SA, **Antonescu ML**, Fenyo IM, Raicu M, Simionescu M, Manea A (2018) Epigenetic regulation of vascular NADPH oxidase expression and reactive oxygen species

production by histone deacetylase-dependent mechanisms in experimental diabetes. *Redox Biology* 16: 332-343. ***Factor de impact 7,8***

4. Stanica L, Rosu-Hamzescu M, Gheorghiu M, Stan M, **Antonescu ML**, Polonschii C, Gheorghiu E (2017) Electro-optical sensing of cellular effects under hypoxic conditions and carbonic anhydrase inhibition. *Hindawi Limited* 10: 1155. ***Factor de impact 1.34***

Articole în pregătire

1. **Vlad ML**, Lazar AG, Fenyo IM, Manea SA, Manea A (2020) Inhibition of miR-155-5p reduces NADPH oxidase expression and oxidative stress in the aorta of hypercholesterolemic ApoE-deficient mice; potential implication in human atherosclerosis. *Cells.* **Factor de impact: 4.37**.
2. Manea SA, **Vlad ML**, Rebleanu D, Lazar AG, Calin M, Simionescu M, Manea A (2020) High resolution near-infrared fluorescence imaging of reactive oxygen species overproduction associated with atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *Antioxidants.* ***Factor de impact: 5.01.***

Prezentări orale

1. Lazar A, Cosac MT, **Vlad ML**, Manea A, Manea SA. Cross-communication between histone acetyltransferase and histone deacetylase epigenetic enzymes augments oxidative stress and fibrosis in the kidney of diabetic mice. "European Atherosclerosis Society Congress 2019 – 87th EAS Congress". Science at a Glance Section, Netherlands, 2019.
2. **Antonescu ML**, Manea SA, Fenyo IM, Constantin A, Simionescu M, Manea A. Epigenetic mechanisms of oxidative stress in atherosclerosis., EAS advanced course on AIL, March 22-25 2016, Amsterdam, Netherlands.

Lista posterelor prezentate la manifestări ştiinţifice

1. **Vlad ML**, Manea SA, Lazar AG, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A. Epigenetic regulation of NADPH oxidase 5 expression by histone acetyltransferase-activated mechanisms in human macrophages exposed to inflammatory conditions; potential role in atherosclerosis. "ICBP Nicolae Simionescu - 40 years, Anniversary symposium", 2019
2. Lazar AG, Cosac MT, **Vlad ML**, Raicu M, Manea A, Manea SA. Activation of p300 histone acetyltransferase-dependent signaling pathways induces NADPH oxidase

expression and oxidative stress in the kidney of diabetic mice. "ICBP Nicolae Simionescu - 40 years, Anniversary symposium", 2019

3. **Vlad ML**, Manea SA, Lazar AG, Cosac MT, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A. Activation of histone acetyltransferase-dependent signaling pathways induces macrophage polarization towards a pro-inflammatory M1-like phenotype in vitro; potential implication in human atherosclerosis. "The 11th National Congress with International Participation and the 37th Annual Scientific Session of the Romanian Society of Cell Biology", 20-23 iunie 2019, Constanta, Romania
4. Lazar AG, Cosac MT, **Vlad ML**, Raicu M, Manea A, Manea SA Activation of P300 histone acetyltransferase dependent signaling pathways induces NADPH oxidase expression and oxidative stress in the kidney of diabetic mice. "The 11th National Congress with International Participation and the 37th Annual Scientific Session of the Romanian Society of Cell Biology", 20-23 iunie 2019, Constanta, Romania
5. Cosac MT, **Vlad ML**, Manea SA, Lazar AG, Raicu M, Simionescu M, Manea A. Pharmacological inhibition of histone lysine demethylase JARID1b down-regulates the expression of pro-inflammatory molecules in cultured M1-polarized human macrophages. "The 11th National Congress with International Participation and the 37th Annual Scientific Session of the Romanian Society of Cell Biology", 20-23 iunie 2019, Constanta, Romania
6. Manea A, Manea SA, **Vlad ML**, Lazar AG, Cosac MT, Simionescu M. Histone deacetylase subtypes are part of positive feedback mechanisms controlling their own expression in the atherosclerotic aorta of hypercholesterolemic ApoE-/- mice. "29th European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection", 2019
7. Manea SA, **Vlad ML**, Lazar AG, Fenyo IM, Cosac MT, Manea A. Identification of novel microRNAs associated with atherosclerotic lesion formation in the aorta of hypercholesterolemic ApoE-/- mice; potential implications for human atherosclerosis. "29th European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection", 2019
8. **Vlad ML**, Manea SA, Lazar AG, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A. NADPH oxidase – derived reactive oxygen species augment inflammatory macrophage responses via redox-sensitive histone deacetylase-dependent epigenetic mechanisms in experimental atherosclerosis. "European Atherosclerosis Society Congress 2019 – 87th EAS Congress" 26-29 Mai 2019, Maastricht, Olanda
9. Lazar AG, Cosac MT, **Vlad ML**, Manea A, Manea SA Cross communication between histone acetyltransferase and histone deacetylase epigenetic enzymes auguments oxidative stress and fibrosis in the kidney of diabetic mice. European Atherosclerosis Society Congress 2019 – 87th EAS Congress" 26-29 Mai 2019, Maastricht, Olanda
10. Manea SA, **Vlad ML**, Lazar AG, Cosac MT, Muresian H, Simionescu M, Manea A. Novel microRNAs associated with advanced human atherosclerotic lesions - potential biomarkers and therapeutic targets. "5th ESPT Congress - Precision Medicine and Personalised Health", 2019
11. Manea A, Manea SA, **Vlad ML**, Lazar AG, Cosac MT, Simionescu M. P300/CBP-histone acetyltransferase mediates the up-regulation of NADPH oxidase expression and

oxidative stress in the aorta of diabetic mice. "7th World Congress on Controversies to Consensus in Diabetes, Obesity and Hypertension", 2019

12. Manea SA, Lazar AG, **Vlad ML**, Cosac MT, Manea A. Induction of histone deacetylase signaling pathways augments vascular inflammation and remodeling in diabetic mice. "7th World Congress on Controversies to Consensus in Diabetes, Obesity and Hypertension", 2019
13. Manea SA, **Antonescu ML**, Rebleanu D, Lazar AG, Calin M, Manea A Ultrasound-based imaging of reactive oxygen species overproduction associated with atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. The 43rd FEBS Congress 2018, Czech Republic
14. Manea A, Manea SA, **Antonescu ML**, Lazar AG, Muresian H, Simionescu M. Epigenetic regulation of inflammatory macrophage polarization by histone deacetylase-dependent mechanisms in experimental atherosclerosis. The 43rd FEBS Congress 2018, Czech Republic
15. **Antonescu ML**, Manea SA, Lazar AG, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A. Epigenetic control of macrophage polarization by histone acetylation/deacetylation enzymes in experimental atherosclerosis. "The 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 10th National Congress with International participation", 2018, Craiova, Romania
16. Manea SA, **Antonescu ML**, Rebleanu D, Lazar AG, Raicu M, Calin M, Manea A. High resolution near-infrared fluorescence imaging of reactive oxygen species overproduction associated with atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. "The 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 10th National Congress with International participation", 2018, Craiova, Romania
17. Lazar AG, **Antonescu ML**, Fenyo IM, Manea A, Manea SA. Histone acetyltransferase-dependent signaling pathways mediate endothelin-1 up-regulation and markers of vascular dysfunction in experimental diabetes. "1st Olympiad in Cardiovascular Medicine", International Symposium on Experimental & Clinical Cardiology, 17-19 Mai 2018, Athens, Greece
18. **Antonescu ML**, Lazar AG, Manea SA, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A. Pharmacological inhibition of NADPH oxidase down-regulates the expression of pro-inflammatory markers in classically-activated macrophages in vitro: potential implication in human atherosclerosis. "1st Olympiad in Cardiovascular Medicine", International Symposium on Experimental & Clinical Cardiology, 17-19 Mai 2018, Athens, Greece
19. **Antonescu ML**, Lazar AG, Manea SA, Raicu M, Muresian H, Manea A, Simionescu M. Up-regulation of macrophage NADPH oxidase 5 expression and reactive oxygen species production by histone acetyltransferase-dependent mechanisms in atherosclerosis. "Protecting the Code: Epigenetic Impacts on Genome Stability", 28 octombrie – 02 noiembrie 2017, Berlin, Germania
20. Manea SA, **Antonescu ML**, Lazar A, Fenyo IM, Manea A. Pharmacological inhibition of histone acetyltransferase reduces endothelin-1 expression and mitigates markers of

vascular dysfunction in diabetes. "European Society for Pharmacogenomics and Personalized Therapy, 4th Conference", 2017

21. **Antonescu ML**, Manea SA, Simionescu M, Manea A. NADPH oxidase 5 expression are is regulated by histone acetyltransferase 1 and P300 – dependent in human macrophages. "85th EAS Congress", 23-26 aprilie 2017, Praga
22. Manea A, **Antonescu ML**, Fenyo IM, Manea M. In vivo silencing of histone deacetylase 1 displays anti-atherosclerotic effects in hypercholesterolemic apolipoprotein E deficient mice. "Heart Failure 2017 - 4th World Congress on Acute Heart Failure", 28 aprilie - 04 mai 2017, Paris, Franta
23. Manea A, Manea SA, **Antonescu ML**, Fenyo IM, Raicu M, Simionescu M. Protein expression profiling of histone acetyltransferases and histone deacetylases in human and experimental atherosclerosis. "Heart Failure 2017 - 4th World Congress on Acute Heart Failure", 28 aprilie - 04 mai 2017, Paris, Franta
24. **Antonescu ML**, Manea SA, Muresian H, Simionescu M, Manea A. Histone acetyltransferases control macrophage-type NADPH oxidase 5 up-regulation and reactive oxygen species formation in atherosclerosis. "9th National Congress with International Participation and 35th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology", 06 - 12 iunie 2017, Iasi, Romania
25. Manea SA, Fenyo IM, **Antonescu ML**, Preda B, Raicu M, Muresian H, Manea A. Histone deacetylase-dependent epigenetic pathways mediate oxidative stress and inflammation in experimental atherosclerosis. "9th National Congress with International Participation and 35th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology", 06 - 12 iunie 2017, Iasi, Romania
26. Manea SA, **Antonescu ML**, Lazar A, Fenyo IM, Manea A. Pharmacological inhibition of histone acetyltransferase reduces endothelin-1 expression and mitigates markers of vascular dysfunction in diabetes. "European Society for Pharmacogenomics and Personalized Therapy, 4th Conference", 2017
27. Manea SA, **Antonescu ML**, Lazar AG, Fenyo IM, Manea A. Pharmacological inhibition of histone acetyltransferase reduces endothelin-1 expression and mitigates markers of vascular dysfunction in diabetes. "European Society for Pharmacogenomics and Personalized Therapy, 4th Conference", 03 - 08 octombrie 2017, Catania, Italy
28. **Antonescu ML**, Manea SA, Simionescu M, Manea A. Epigenetic regulation of NADPH oxidase 5 expression by p300/histone acetyltransferase in human macrophages. 8th National Congress with International Participation and 34rd Annual Scientific Session of the RSCB, 8-12 iunie 2016, Oradea, Bulletin of Romanian Society for Cell Biology, No. 44, June 2016, pg. 74
29. Manea A, Manea SA, **Antonescu ML**, Fenyo IM, Raicu M, Simionescu M. Pharmacological inhibition of histone deacetylase reduces vascular NADPH oxidase expression and reactive oxygen species formation in experimental diabetes. 8th National Congress with International Participation and 34rd Annual Scientific Session of the

RSCB, 8-12 iunie 2016, Oradea, Bulletin of Romanian Society for Cell Biology, No. 44, June 2016, pg 80

30. Manea A, Manea SA, Fenyo IM, **Antonescu ML**, Raicu M, Simionescu M. Pharmacological inhibition of histone deacetylase reduces oxidative stress and inflammation in the aorta of diabetic mice. The 4th International Symposium on Adipobiology and Adipopharmacology (ISAA), 28-31 octombrie 2015, Bucuresti, Romanian Journal of Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases, Volumul 22 (2015)/Supplement 2, pg. 29

Premii

Premii UEFISCDI

1. **Antonescu ML**, Manea SA, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A (2019) Histone acetyltransferase-dependent pathways mediate NADPH oxidase 5 up-regulation in human macrophages under inflammatory conditions: a potential mechanism of reactive oxygen species overproduction in atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev* 2:3201062. ***Factor de impact: 5,08***
2. Manea SA, **Antonescu ML**, Fenyo IM, Raicu M, Simionescu M, Manea A (2018) Epigenetic regulation of vascular NADPH oxidase expression and reactive oxygen species production by histone deacetylase-dependent mechanisms in experimental diabetes. *Redox Biology* 16: 332-343. ***Factor de impact 7,8***

Premii postere

1. **Antonescu ML**, Manea SA, Lazar AG, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A. Epigenetic control of macrophage polarization by histone acetylation/deacetylation enzymes in experimental atherosclerosis. "The 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 10th National Congress with International participation", 2018, Craiova, Romania
2. Lazar AG, Cosac MT, **Vlad ML**, Raicu M, Manea A, Manea SA Activation of P300 histone acetyltransferase dependent signaling pathways induces NADPH oxidase expression and oxidative stress in the kidney of diabetic mice. "The 11th National Congress with International Participation and the 37th Annual Scientific Session of the Romanian Society of Cell Biology", 20-23 iunie 2019, Constanta, Romania

Granturi

1. PNCDI III, **P2 - Creșterea competitivității economiei românești prin CDI**
Tip proiect: Proiect experimental demonstrativ (PED), Contract nr. 342/2020
Titlul proiectului: Strategie teranostica avansata in ateroscleroza care integreaza interventii farmaco-epigenomice si microbule biomimetice pentru administrarea tintita a medicamentelor cu ajutorul ultrasunetelor
Perioada: August 2020 - Iulie 2022
Director de proiect: Dr. Adrian Manea

2. PNCDI III, P2 - Creșterea competitivității economiei românești prin CDI
Tip proiect: Proiect experimental demonstrativ (PED), Contract nr. 265/2020
Titlul proiectului: Strategie farmacologica inovatoare bazata pe triterpene pentru tratamentul complicatiilor micro- si macrovasculare asociate diabetului zaharat – studiu preclinic
Perioada: August 2020 - Iulie 2022
Director de proiect: Dr. Simona-Adriana Manea

3. PNCDI III, Programul 4 - Cercetare fundamentala si de frontiera
Tip proiect: Proiecte complexe de cercetare de frontiera, Contract nr. 5/2018
Titlul proiectului: Tintirea mecanismelor imunitatii innascute pentru o mai buna stratificare a riscului si identificarea de noi optiuni terapeutice in infarctul de miocard
Perioada: Iulie 2018 - Iunie 2022
Director de proiect: Acad. Maya Simionescu

4. Programul Operaţional Competitivitate, Axa prioritară 1: Cercetare, dezvoltare tehnologică şi inovare (CDI) în sprijinul competitivităţii economice şi dezvoltării afacerilor
Tip proiect: Atragerea de personal cu competențe avansate din străinătate pentru consolidarea capacității de CD, Contract nr.115/2016
Titlul proiectului: Terapii tintite pentru boala valvei aortice in diabet (THERAVALDIS)
Perioada: Septembrie 2016 - Decembrie 2020
Director de proiect: Dr. Agneta Simionescu

5. PNCDI III, Programul 1 - Dezvoltarea sistemului national de cercetare dezvoltare
Tip proiect: Proiecte de cercetare pentru stimularea tinerelor echipe independente, Contract nr. 51/2018
Titlul proiectului: Strategie preclinica pentru reducerea inflamatiei vasculare si stresului oxidativ in ateroscleroza prin modularea unor noi mecanisme moleculare dependente de ARN necodant
Perioada: Mai 2018 - Iulie 2020
Director de proiect: Dr. Adrian Manea

6. PNCDI III, Programul 4 - Cercetare fundamentala si de frontiera

Tip proiect: Proiecte de cercetare exploratorie, Contract nr. 69/2017
Titlul proiectului: Noi mecanisme epigenetice implicate in activarea macrofagelor antiinflamatorii - potentiale tinte terapeutice in ateroscleroza
Perioada: Iulie 2017 - Decembrie 2019
Director de proiect: Acad. Maya Simionescu

7. PNCDI III, Programul 2 - Cresterea competitivitatii economiei romanesti prin cercetare, dezvoltare si inovare
Tip proiect: Proiect experimental - demonstrativ, Contract nr. 137/2017
Titlul proiectului: Metoda neinvaziva bazata pe nanotehnologie pentru imagistica moleculara a stresului oxidativ in bolile cardiovasculare
Perioada: Ianuarie 2017– Septembrie 2018
Director de proiect: Dr. Adrian Manea

8. PNII IDEI, Contract nr. 107/2011
Titlul proiectului: Mecanisme moleculare implicate in reglarea stresului oxidativ in ateroscleroza: dezvoltarea unor nanocomplexe functionale inovative pentru terapia antioxidanta
Perioada: Ianuarie 2012– Decembrie 2016
Director de proiect: Acad. Maya Simionescu

Bibliografie selectivă

1. Aikawa M, Libby P (2004) Atherosclerotic plaque inflammation: The final frontier?. *Canadian Journal of Cardiology* 20: 631-4.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2007) Molecular biology of the cell. Garland Science.
3. Chen F, Li X, Aquadro E, Haigh S, Zhou J, Stepp DW, Weintraub NL, Barman SA, Fulton DJR (2016) Inhibition of histone deacetylase reduces transcription of NADPH oxidases and ROS production and ameliorates pulmonary arterial hypertension. *Free Radical Biology and Medicine* 99:167-178.

4. Chen X, Barozzi I, Termanini A, Prosperini E, Recchiuti A, Dalli J, Mietton F, Matteoli G, Hiebert S, Natoli G (2012) Requirement for the histone deacetylase Hdac3for the inflammatory gene expression program in macrophages. *Proc. Natl. Acad.Sci. U. S. A*. 109: E2865–E2874.
5. Chinetti-Gbaguidi G, Sophie C, Staels B (2015) Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology* 12:10–17.
6. Hassle M, Egger G (2012) Epigenomics of cancer - emerging new concepts. Biochimie 10: 1-12.
7. Kietzmann T, Petry A, Shvetsova A, Gerhold JM, Görlach A (2017) The epigenetic landscape related to reactive oxygen species formation in the cardiovascular system. British Journal of Pharmacology 174: 1533-1554.
8. Khyzha N, Alizada A, Wilson MD, Fish JE (2017) Epigenetics of atherosclerosis: emerging mechanisms and methods. Trends in Molecular Medicine 23: 332-347.
9. Kouzarides T (2007) Chromatin Modifications and Their Function. Cell 128: 693-705.
10. Kurdistani SK, Tavazoie S, Grunstein M (2004) Mapping Global Histone Acetylation Patterns to Gene Expression. Cell 11: 721–733.
11. Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. Nature 420: 19-26.
12. Libby P, Ridker PM (2006) Inflammation and Atherothrombosis: From Population Biology and Bench Research to Clinical Practice. Journal of the American College of Cardiology 48: A33-46.
13. Manea A, Manea SA, Gafencu AV, Raicu M, Simionescu M (2008) AP-1-dependenttranscriptional regulation of NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells:role of p22phox subunit. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 28: 878–885.
14. Manea A (2010) NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology. *Cell and Tissue Research* 342: 325-339.
15. Manea A, Tanase LI, Raicu M, Simionescu M (2010) Jak/STAT signaling pathwayregulates nox1 and nox4-based NADPH oxidase in human aortic smooth musclecells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30: 105–112.
16. Manea A, Tanase LI, Raicu M, Simionescu M (2010) Transcriptional regulation ofNADPH oxidase isoforms, Nox1 and Nox4, by nuclear factor-kappaB in humanaortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 396: 901–907.
17. Manea A, Simionescu M (2012) Nox enzymes and oxidative stress in atherosclerosis. Frontiers in Bioscience (Scholar Edition) 4: 651-670.
18. Manea A, Manea SA, Florea IC, Luca CM, Raicu M (2012) Positive regulation of NADPH oxidase 5 by proinflammatory-related mechanisms in human aortic smooth muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine* 52: 1497-1507.
19. Manea SA, Todirita A, Raicu M, Manea A (2014) C/EBP transcription factors regulate NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells. Journal of Cellular and Molecular Medicine 18: 1467-1477.

20. Manea A, Manea SA, Gan AM, Constantin A, Fenyo IM, Raicu M, Muresian H, Simionescu M (2015) Human monocytes and macrophages express NADPH oxidase 5; a potential source of reactive oxygen species in atherosclerosis. Biochem Biophys Res Commun 461:172-9.
21. Manea SA, Constantin A, Manda G, Sasson S, Manea A (2015) Regulation of Nox enzymes expression in vascular pathophysiology: Focusing on transcription factors and epigenetic mechanisms. Redox Biology 5: 358-366.
22. Manea SA, Fenyo IM, Manea A (2016) c-Src tyrosine kinase mediates high glucose-induced endothelin-1 expression. International Journal of Biochemistry & Cell Biology 75: 123-130.
23. Manea SA, Antonescu ML, Fenyo IM, Raicu M, Simionescu M, Manea A (2018) Epigenetic regulation of vascular NADPH oxidase expression and reactive oxygen species production by histone deacetylase-dependent mechanisms in experimental diabetes. Redox Biology 16: 332-343.
24. Schiano C, Vietri MT, Grimaldi V, Picascia A, De Pascale MR, Napoli C (2015) Epigenetic-related therapeutic challenges in cardiovascular disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 36: 226-235.
25. Selemidis S, Sobey CG, Wingler K, Schmidt HH, Drummond GR (2008) NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacol Ther* 120:254-91.
26. Sima AV, Stancu CS, Simionescu M (2008) Vacular endothelium in atherosclerosis. *Cell and Tissue Research* 335: 191.
27. Simionescu M (2007) Implications of Early-Structural-Functional Changes in the Endothelium for Vascular Diseases. *Atherosclerosis, Trombosis and Vascular Biology* 2: 266-74.
28. Simionescu N, Vasile E, Lupu F, Popescu G, Simionescu M (1986) Prelesional events in atherogenesis. Accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit. The American Journal of Pathology 123: 109-125.
29. Soto Y, Acosta E, Delgaro L, Pérez A, Falcón V, Bécquer MA, Fraga Á, Brito V, Álvarez I, Griñán T, Fernández-Marrero Y, López-Requena A, Noa M, Fernández E, Vázquez AM (2012) Antiatherosclerotic effect of an antibody that binds to extracellular matrix glycosaminoglycans. Arterioscler Thromb Vasc Biol 32(3): 595-604.
30. Sumida A, Canugovi C, Lozhkin A, Hayami T, Madamanchi NR, Runge MS (2019) NOXA1-dependent NADPH oxidase regulates redox signaling andphenotype of vascular smooth muscle cell during atherogenesis. *Redox Biol.* 21: 101063.
31. Wang Y, Miao X, Liu Y, Li F, Liu Q, Sun J, Cai L (2014) Dysregulation of Histone Acetyltransferases and Deacetylases in Cardiovascular Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longetivity* 10: 641968-61979.

32. Wang ZY, Qin W, Yi F (2015) Targeting histone deacetylases: perspectives for epigenetic-based therapy in cardio-cerebrovascular disease. *J. Geriatr. Cardiol.* 12: 153–164.
33. Zhong Y, Li J, Wang JJ, Chen C, Tran JT, Saadi A, Yu Q, Le YZ, Mandal MN, Anderson RE, Zhang SX (2012) X-box binding protein 1 is essential for the anti-oxidantdefense and cell survival in the retinal pigment epithelium. *PLoS One* 7: e38616.

ACADEMIA ROMÂNĂ
Şcoala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie și Patologie Celulară "N. Simionescu"

REZUMAT

MECANISME CELULARE ȘI MOLECULARE IMPLICATE ÎN REMODELAREA MATRICEI EXTRACELULARE ASOCIATĂ BOLILOR CARDIOVASCULARE

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
ACAD. ILEANA MÂNDUȚEANU

DOCTORAND:
RĂZVAN DANIEL MACARIE

2023

CUPRINS

I. INTRODUCERE 11

II. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII 17

1. **ANATOMIA SISTEMULUI CARDIOVASCULAR ȘI A VALVEI AORTICE** 18

1.1. Anatomia arterelor mari 20

1.2. Anatomia valvei aortice 22

2. **MATRICEA EXTRACELULARĂ** 26

2.1. Membrana bazală 31

2.1.1. Colagenul de tip IV 31

2.1.2. Lamininele 32

2.2. Matricea extracelulară interstițială 33

2.2.1. Colagenii 33

2.2.1.1. Clasificarea colagenilor 35

2.2.2. Proteoglicanii și glicozaminoglicanii 41

2.2.2.1. Proteoglicanii 41

2.2.2.2. Glicozaminoglicanii 42

2.2.3. Elastina 43

2.2.4. Receptori celulari pentru moleculele de MEC – integrinele 45

3. **REMODELAREA MATRICEI EXTRACELULARE** 48

3.1. Metaloproteinazele matriceale 48

3.1.1. Catepsinele 54

3.1.2. Inhibitori ai MMP 54

4. **ATEROSCLEROZA** 57

4.1. Aspecte generale 57

4.2. Etapele aterosclerozei 58

4.2.1. Inițierea aterosclerozei 58

4.2.2. Progresia aterosclerozei 60

4.2.3. Complicațiile aterosclerozei 64

5. **BOALA VALVEI AORTICE** 67

5.1. Aspecte generale 67

5.2. Etapele evoluției bolii 68

5.3. Rolul și modificările MEC în BVA 71

6. **DIABETUL** 76

6.1. Aspecte generale 76

6.2. Rolul diabetului în progresia bolilor cardiovasculare 78

6.2.1. Inflamația în DZ 78

6.2.2. Formarea de AGE 79

6.2.3. Rolul PKC 80

6.2.4. Hipertensiunea 81

III. CONTRIBUȚII ORIGINALE 82

1. **COMUNICAREA DINTRE CELULELE MUSCULARE NETEDE ŞI MACROFAGE ACCELEREAZĂ EVOLUȚIA PLĂCII ATEROSCLEROTICE CĂTRE PLACĂ VULNERABILĂ ŞI RUPEREA PLĂCII PRIN INDUCEREA MEDIATORILOR INFLAMATORI** 83

1.1. Introducere ... *83*

1.2. Materiale şi metode ... *85*

1.2.1. Culturi celulare ... 85

1.2.2. Design experimental ... 85

1.2.3. Array de proteine ... 86

1.2.4. Izolare ARN și qPCR ... 86

1.2.5. ELISA ... 88

1.2.6. Western Blot ... 88

1.2.7. Analiza statistică ... 89

1.3. Rezultate și discuții ... *90*

1.3.1. Interacția CMN-MØ induce secreția de mediatori inflamatori ... 90

1.3.2. Modificări ale fenotipului celulelor musculare netede induse de interacția cu macrofage ... 92

1.3.2.1. Interacţia CMN-MØ reduce expresia de α-SMA, osteopontină şi CD36 în CMN ... 92

1.3.2.2. Interacția CMN-MØ creşte expresia şi secreţia de IL-6 în CMN ... 93

1.3.2.3. Interacția CMN-MØ creşte expresia şi secreţia de CCL5 în CMN ... 94

1.3.3. Căi de semnalizare implicate în interacţia CMN-MØ ... 96

1.3.3.1. Calea de semnalizare ERK1/2 este activată în CMN în urma interacției cu MØ ... 96

1.3.3.2. Investigarea activării inflamazomului în CMN în urma interacției cu macrofagele ... 97

1.3.4. Modificări moleculare induse în MØ după interacția cu CMN ... 98

1.3.4.1. Interacţia cu CMN creşte expresia de MIP-1β în macrofage ... 98

1.3.5. Căi de semnalizare activate în macrofage în urma interacției cu CMN ... 99

1.4. Concluzii ... *101*

2. **DIABETUL ACCENTUEAZĂ REMODELAREA MATRICEI EXTRACELULARE INDUSĂ DE COMUNICAREA CELULELOR MUSCULARE NETEDE CU MACROFAGELE** 102

2.1. Introducere ... *102*

2.2. Materiale și metode ... *104*

2.2.1. Culturi de celule ... 104

2.2.2. Design experimental ... 105

2.2.3. Western Blot ... 105

2.2.4. Transfecția cu ARN mic de interferență ... 106

2.2.5. Evaluarea asamblării colagenului mediată de CMN ... 106

2.3. Rezultate și discuții ... *107*

2.3.1. ADAMTS1, MMP-1, MMP-3, MMP-9 şi urokinaza sunt eliberate în mediul condiţionat ca urmare a interacției dintre CMN-MØ ... 107

2.3.2. Evaluarea expresiei MMP în interacția CMN cu MØ în condiții diabetice ... 109

2.3.3. Expresia de MMP-1 și MMP-9 este reglată prin CCR2 și NF-kB în CMN interacţionate cu macrofage în condiții de glucoză crescută ... 110

2.3.4. PKCα reglează expresia MMP-1 şi MMP-9 în CMN interacţionate cu macrofage în condiții de glucoză crescută ... 112

2.3.5. Evaluarea funcţională a capacității CMN de a forma fibre de colagen în condiţii de glucoză crescută ... 113

2.4. Concluzii *115*

3. **DIABETUL TIMPURIU INDUCE REMODELAREA MATRICEI ȘI MODIFICĂRI FUNCȚIONALE ÎN VALVA AORTICĂ ÎNTR-UN MODEL MURIN DE ATEROSCLEROZĂ ȘI ÎNTR-UN MODEL DE CULTURĂ CELULARĂ TRIDIMENSIONALĂ** 117

3.1. Introducere *117*

3.2. Materiale și metode *120*

3.2.1. Model șoarece diabetic hiperlipemic ApoE$^{-/-}$ 120

3.2.2. Colorații histochimice 121

3.2.3. Măsurarea parametrilor plasmatici 122

3.2.4. Imunofluorescență 123

3.2.5. Cuantificarea semi-cantitativă a imaginilor de imunofluorescență 124

3.2.6. Obținerea celulelor primare valvulare 124

3.2.7. Model de Cultură Celulară Tridimensională 125

3.2.8. qPCR 125

3.2.9. Western Blot 126

3.2.10. Analiza statistică 127

3.3. Rezultate și discuții *128*

3.3.1. Șoarecii menținuți pe dietă hiperlipemică prezintă nivele crescute ale glicemiei, prezintă modificări ale țesutului conjunctiv și dezvoltă depozite lipidice la nivelul valvei aortice 128

3.3.2. Hiperglicemia modifică fenotipul celulelor valvulare, inducând expresia markerilor de activare valvulari 132

3.3.3. Expresia moleculelor țesutului conjunctiv valvular nu este modificată în valva aortică a șoarecilor ApoE$^{-/-}$ hiperlipemici cu diabet timpuriu 134

3.3.4. Expresia moleculelor care reglează homeostazia și remodelarea matricei extracelulare dar și a motilității celulare 136

3.3.5. Expresia moleculelor implicate în remodelarea tisulară se corelează cu markerii de remodelare și calcificare, indicii plasmatici și hemodinamici 138

3.3.6. Dezvoltarea unui model 3D de foiță valvulară 140

3.3.7. Expunerea modelului 3D la concentrație crescută de glucoză modulează moleculele de matrice extracelulară exprimate de VIC 141

3.3.8. În modelul 3D de foiță valvulară, MMP-1 și MMP-13 sunt induse semnificativ de concentrația crescută de glucoză în VIC 144

3.3.9. Subunitățile integrinice α și β sunt modulate de concentrația crescută de glucoză în ambele tipuri de celule valvulare din modelul 3D 145

3.4. Concluzii *148*

4. **ANALIZA BIOINFORMATICĂ A COMUNICĂRII DINTRE CELULELE VALVULARE ÎNTR-UN MODEL DE ȘOARECE DEFICIENT IN APOE** 149

4.1. Introducere *149*

4.2. Metode *150*

4.2.1. Procesarea și analiza datelor de sc-RNAseq 150

4.2.1.1. Controlul calității datelor 151

4.2.1.2. Normalizarea datelor 154

4.2.1.3. Integrarea datelor 154

4.2.1.4. Vizualizarea datelor – analiza de tip PCA și proiecția UMAP 155

4.2.1.5. Gruparea celulelor 158
4.2.2. Analiza de expresie genică diferențială 158
4.2.3. Analiza îmbogățirii setului de gene - GSEA 159
4.2.4. Analiza NicheNet pentru modelarea comunicației intercelulare 160
4.2.4.1. Definirea unui set de gene de interes și a unei populații receptor 160
4.2.4.2. Definirea genelor exprimate în populațiile expeditor 161
4.2.4.3. Definirea unor potențiali liganzi și calcularea activității liganzilor în setul de gene de interes 161
4.2.4.4. Determinarea genelor țintă și a receptorilor pentru liganzii de top clasificați în analiza NicheNet 162
4.2.4.5. Calcularea expresiei diferențiale a liganzilor în celulele expeditor în condiția Apoe$^{-/-}$ vs control 162
4.3. Rezultate și discuții 163
4.3.1. Analiza sc-RNAseq a celulelor valvulare în șoarecele control și în șoarecele Apoe$^{-/-}$ 163
4.3.1.1. Analiza sc-RNAseq arată existența a 14 grupuri de celule valvulare atât în șoarecele control cât și în cel Apoe$^{-/-}$ 163
4.3.1.2. Determinarea genelor care definesc grupurile celulare identificate la nivelul valvei aortice murine 165
4.3.1.3. Determinarea genelor definitorii pentru grupurile de macrofage 170
4.3.1.4. Determinarea genelor definitorii pentru celulele valvulare interstițiale 176
4.3.2. Analiza diferențială a expresiei genice în grupurile de VIC și macrofage în condiția Apoe$^{-/-}$ versus control (C57BL/6J) 186
4.3.2.1. Expresia diferențială a genelor din grupul Mac Lyve1^{+} în șoarecele hiperlipidemic 186
4.3.2.2. Expresia diferențială a genelor din grupul Mac CD11c^{+} în șoarecele hiperlipidemic 188
4.3.2.3. Expresia diferențială a genelor din grupul VIC Meox1^{+} în șoarecele hiperlipidemic 192
4.3.2.4. Expresia diferențială a genelor din grupul VIC Clec3b^{+} în șoarecele hiperlipidemic 195
4.3.2.5. Expresia diferențială a genelor din grupul VIC Spp1^{+} în șoarecele hiperlipidemic 197
4.3.3. Analiza îmbogățirii setului de gene (GSEA) pentru genele modificate în grupul VIC Spp1^{+} sugerează că hiperlipidemia induce în principal modificări ale matricei extracelulare și a genelor implicate în formarea de fibre de colagen 202
4.3.4. Modelarea comunicării inter-celulare în valva aortică murină și efectul acesteia asupra genelor clusterului VIC Spp1^{+} modificate în condiția hiperlipidemică 205
4.3.4.1. .Determinarea liganzilor potențiali care pot să explice modificările observate în VIC Spp1^{+} 206
4.3.4.2. Determinarea potențialului reglator al liganzilor prezișI în analiza NicheNet 206
4.3.4.3. Nivelul expresiei genice a liganzilor prezișI de analiza NicheNet în clusterele de celule valvulare 211
4.3.4.4. Modificarea expresiei genice a liganzilor cu potențial de reglare a VIC Spp1+ în condiția Apoe$^{-/-}$ 213
4.3.4.5. Determinarea principalilor receptori exprimați pe suprafața VIC care pot interacționa cu liganzii identificați de analiza NicheNet 214
4.4. Concluzii 216
IV. CONCLUZII GENERALE 218
V. BIBLIOGRAFIE 223

Introducere

Bolile cardiovasculare reprezintă principala cauză de mortalitate în țările dezvoltate (Organization, 9 December 2020) acestea se mențin în topul acestei statistici datorită expunerii tot mai frecvente a omului modern la factorii de risc pentru bolile cardiovasculare. Acești factori de risc includ: fumatul, dieta nesănătoasă, lipsa activității fizice, hiperlipidemia, hipertensiunea, expunerea la poluare, consumul de alcool, obezitatea și nu în ultimul rând diabetul. Diabetul zaharat este cel mai răspândit sindrom metabolic și complicațiile asociate cu acesta sunt majoritar macro- și micro-vasculare conducând la nefropatie, retinopatie și neuropatie ca urmare a accelerării procesului aterosclerotic.

Bolile cardiovasculare cuprind un număr mare de patologii printre care: insuficiența cardiacă, valvulopatiile cardiace și aritmiile, boala cardiacă reumatică (leziuni ale miocardului și valvelor cardiace cauzate de infecția cu *Streptococcus pyogenes*), malformațiile cardiace congenitale, tromboza venoasă profundă cu propria sa complicație, embolia pulmonară și nu în ultimul rând ateroscleroza care prezintă două complicații majore, infarctul miocardic și accidentul vascular cerebral ischemic (Thiriet, 2018).

Ateroscleroza este cea mai importantă patologie subiacentă bolii arteriale coronare, bolii arteriale periferice și a bolilor cerebrovasculare. Fiind o boală a arterelor mari și medii, ateroscleroza presupune acumularea în spațiul subendotelial a lipoproteinelor, în special a lipoproteinelor de densitate mică (LDL), a celulelor imune, dar și a celulelor musculare netede (CMN), acumulare care în timp formează plăci ocluzive care la rândul lor determină stenoza arterială. CMN pe parcursul dezvoltării aterosclerozei produc o serie de proteine de matrice extracelulare (MEC) cum ar fi colagen, elastină, dar și porteoglicani și glicozamino glicani, care contribuie la îngroșarea spațiului sub-intimal dar și la menținerea unui cap fibros. Pe măsură ce placa avansează CMN pot suferi o metaplazie în celule spumoase care înglobează LDL, suferă apoptoză, iar acest conglomerat de resturi celulare împreună cu deficiență a eferocitozei de către macrofage (MØ), conduce la formarea unui miez necrotic. Toți acești factori determină în același timp și creșterea și cronicizarea inflamației și astfel a recrutării macrofagelor care secretă o serie de metaloproteinaze matriceale (MMP) cu rol în degradarea MEC, ceea ce determină o subțiere a capului fibros și determină o predispoziție la rupere a acestuia. Astfel, dacă acumularea inițială de LDL și formarea capului fibros duc la îngustarea arterelor care restricționează fluxul sangvin determinând ischemie și hipoxie tisulară (Wolf and Ley, 2019), ruperea capului fibros determină formarea de trombi care pot

bloca complet arterele determinând în cazul arterelor coronare, infarctul de miocard, iar în cazul arterelor cerebrale, atacul vascular cerebral.

O altă boală cardiovasculară care afectează un număr tot mai însemnat de oameni este **boala valvei aortice (BVA)** (Coffey et al., 2021). Valva aortică este una dintre cele 4 valve care controlează fluxul sangvin în inimă, ea separă ventriculul stâng de aortă. Bolile care afectează această valvă afectează circulația sângelui și se împart în două categorii: stenoza aortică - boală care îngustează orificiul valvular, îngreunând fluxul sangvin și insuficiența (regurgitarea aortică) – boală care determină o închidere incompletă a valvei în diastolă. Cea mai frecventă afecțiune a valvei aortice este stenoza aortică determinată de calcificarea valvei, afecțiune denumită în continuare boala valvei aortice (BVA). Ea este caracterizată de îngroșarea, fibroza și mineralizarea cuspelor aortice. Analiza foițelor aortice a arătat că mineralizarea distrofică și tranziția osteogenică a celulelor valvulare interstițiale (VIC) apar concomitent cu neovascularizarea, microhemoragia și producția anormală de matrice extracelulară (Moncla et al., 2023). Factorii de risc pentru BVA pot fi împărțiți în două categorii, factori de risc care nu pot fi modificați, si anume: vârsta și morfologia bicuspidă congenitală a valvei aortice și factori de risc care pot fi ameliorați ca: tensiunea arterială crescută, nivelul de colesterol din plasmă și prezența obezității și a diabetului zaharat. Interacțiuni complexe între celulele endoteliale și interstițiale ale valvei și celulele imune promovează remodelarea valvei aortice și dezvoltarea BVA. Deoarece, până în prezent nici un tratament medical nu a fost eficient în reducerea sau prevenirea progresiei BVA, studiile care au ca scop identificarea unor posibile ținte terapeutice sunt deosebit de importante.

Impactul bolilor cardiovasculare este în creștere și datorită ratei de creștere a obezității și a diabetului. **Diabetul** este cea mai răspândită boala metabolică, iar povara sa medicală și socio-economică este dată de complicațiile asociate, în special la nivel macrovascular și microvascular. Acestea conduc la retinopatie, neuropatie și nefropatie, ca urmare a accelerării aterogenezei. S-a demonstrat anterior că ambele tipuri de diabet zaharat pot induce dezvoltarea aterosclerozei sau accelerează și mai mult progresia acesteia (Katakami, 2018). Nivelul crescut de glucoză, dislipidemia dar și alte modificări metabolice care însoțesc diabetul sunt strâns legate de patogeneza aterosclerozei. Iar inflamația cronică este prezentă încă de la primele stadii ale inițierii diabetului și este considerată în prezent ca unul dintre factorii cheie în dezvoltarea aterosclerozei (Wolf and Ley, 2019).

În patologia aterosclerozei și a BVA apar transformări semnificative ale **matricei extracelulare**. Matricea extracelulară asigură un cadru vital pentru țesutul vascular și

valvular, având rolul unui schelet ce susține organizarea și homeostazia celulelor. MEC este un ansamblu complex de macromolecule, având impact asupra comportamentului celulelor, promovând diferențierea, migrarea și proliferarea prin intermediul interacțiunilor specifice dintre celule și matrice. Mai mult, MEC ajută și la comunicarea intercelulară, are un rol important în motilitatea, dezvoltarea celulară și repararea țesuturilor lezate, de asemenea acționează și ca un depozit de factori de creștere și molecule bio-active care pot fi eliberate (Silva et al., 2020).

În acest context, studiu de față pornește de la **ipoteza** că inflamația și comunicarea dintre celulele imune și celulele rezidente vasculare (CMN) și valvulare (VIC) poate conduce la modificări patologice ale MEC prin mecanisme celulare și moleculare specifice, iar această remodelare patologică este accelerată în ateroscleroza în condiții de diabet.

Lucrarea de față a fost structurată în două părți principale, o primă secțiune denumită „Stadiul actual al cunoașterii" care explorează literatura existentă privind ateroscleroza, boala valvulară aortică, diabet și impactul acestor patologii asupra matricei extracelulare.

O**biectivul principal** al tezei a fost reprezentat de investigarea mecanismelor celulare și moleculare a remodelării MEC în ateroscleroză și a BVA în contextul diabetului. Rezultatele originale obținute sunt prezentate în a doua secțiune a lucrării, denumită „Contribuții originale" care este structurată în 4 capitole.

Contribuții originale

Capitolul 1 - "Comunicarea dintre celulele musculare netede şi macrofage accelerează evoluția plăcii aterosclerotice către placă vulnerabilă și ruperea plăcii prin inducerea mediatorilor inflamatorii" - a vizat investigarea comunicării patologice dintre CMN și MØ în contextul aterosclerozei.

Contextul patologic al aterosclerozei surprinde o interacțiune între CMN și macrofage care nu este de obicei întâlnită în condiții de homeostazie vasculară. CMN sunt rare în intima arterială și sunt prezente în principal în media arterelor mari de unde migrează către zone unde există infiltrări de LDL și inflamație locală. În aceste zone, ele interacționează cu macrofagele recrutate din circulație în spațiul sub-endotelial și suferă modificări fenotipice care favorizează evoluția aterosclerozei. Ca răspuns la semnalele din micromediul vascular, MØ suferă un proces de polarizare spre macrofage proinflamatoare

(M1) sau anti-inflamatoare (M2) şi induc un fenotip pro-aterogenic în CMN vasculare (Butoi et al., 2011). De asemenea, fenotipul CMN poate influenţa balanţa dintre populaţiile de macrofage M1 sau M2, determinând astfel progresia plăcii aterosclerotice. În placa aterosclerotică, MØ şi CMN pot interacţiona direct - prin molecule exprimate pe suprafaţa celulară (ICAM-1, VCAM-1 şi CX3CL1) şi receptorii lor - sau indirect, prin factori solubili (chemokine şi citokine), care pot modifica fenotipul ambelor tipuri celulare, influenţând astfel evoluţia leziunii aterosclerotice (Manduteanu and Simionescu, 2012).

Anterior, grupul nostru a demonstrat inducerea expresiei unui număr mare de citokine și chemokine în macrofage în urma interacției cu CMN, aceşti mediatori inflamatori amplificând chemotaxia monocitelor (Tucureanu et al., 2016). De asemenea, grupul nostru a arătat că interacția dintre MØ și CMN afectează expresia colagenului I și III, crește sinteza metaloproteazei MMP-9 și promovează angiogeneza, caracteristici care pot contribui la vulnerabilitatea plăcii (Butoi et al., 2016).

În studiul de faţă, pentru a investiga contribuţia comunicării dintre macrofage şi CMN în agravarea leziunii aterosclerotice, am investigat mediatorii inflamatori induşi de interacţia CMN-MØ, modificarea fenotipică a CMN în urma interacţiei celulare şi căile de semnalizare implicate în comunicarea dintre CMN-MØ.

Modelul experimental folosit în acest capitol a fost un model *in vitro* care a presupus o cameră dublă Boyden cu macrofage diferențiate, în camera superioră, pe un insert cu pori de 4 μm și CMN însămânțate în camera de jos. Metodele de studiu au inclus tehnici de western blot (WB), teste imunosorbent legat de enzime (ELISA), protein array și reacția cantitativă de polimerizare în lanț în timp real (qPCR).

Rezultatele acestui capitol au arătat că interacția indirectă a CMN cu macrofagele induce secreția de mediatori inflamatori precum: G-CSF, GM-CSF, ICAM-1, IL-6, CCL5.

Interacţia dintre CMN-MØ modifică fenotipul normal al CMN (Figura 1) prin scăderea α-SMA, ceea ce poate determina o scădere a capacității contractile. Totuși fenotipul CMN nu este unul pro-osteoblastic deoarece nivelul de osteopontină este și el scăzut în interacție.

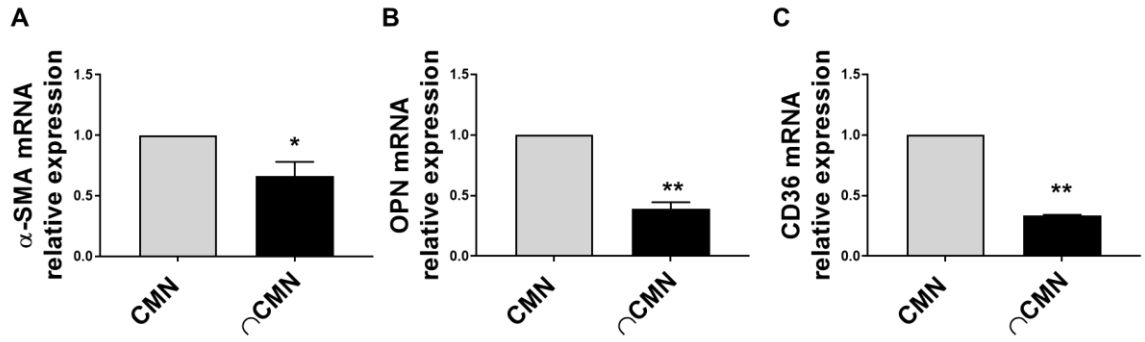


Figura 1 *Expresia genică a markerilor fenotipici ai CMN este scăzută în urma interacţiei cu MØ. Expresia genică a αSMA (A), osteopontinei (OPN) (B) şi CD36 (C) a fost determinată prin RealTime PCR în CMN interacţionate cu MØ (∩CMN) sau CMN control.*

Interacţia CMN-MØ induce expresia citokinei IL-6 (Figura 2) şi a chemokinei CCL5 (Figura 3) în CMN, molecule cu rol important în progresia plăcii aterosclerotice.

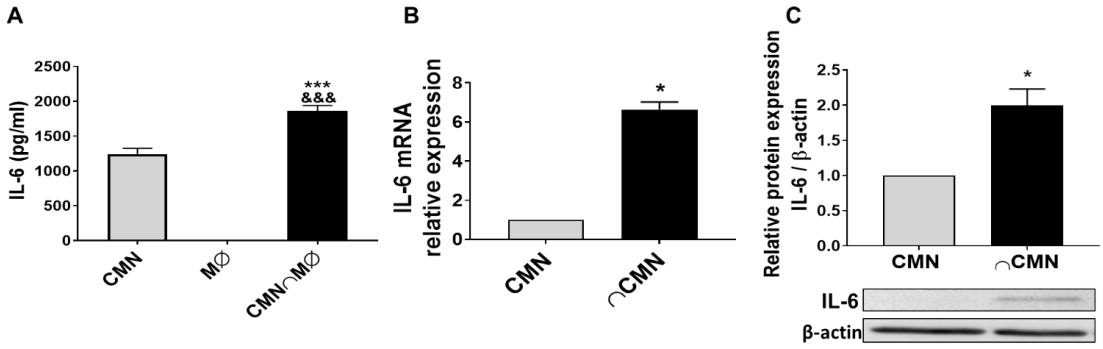


Figura 2 *Secreţia şi expresia IL-6 este crescută în CMN în urma interacţiei cu macrofagele.*

Se cunoaşte faptul că migrarea CMN în intima peretelui vascular este ghidată de chemokinele secretate de celulele imune şi rezidente în placa aterosclerotică (Tedgui and Mallat, 2006). CCL5 (RANTES) este o chemokină cu rol esenţial în procesul inflamator, prin recrutarea celulelor imune la locul inflamaţiei. Expresia CCL5 este crescută în celulele peretelui vascular iar blocarea legării CCL5 la receptorul său (CCR5) a arătat o reducere a formării plăcii aterosclerotice şi prevenirea progresiei leziunilor aterosclerotice la şoareci (Liu et al., 2012).

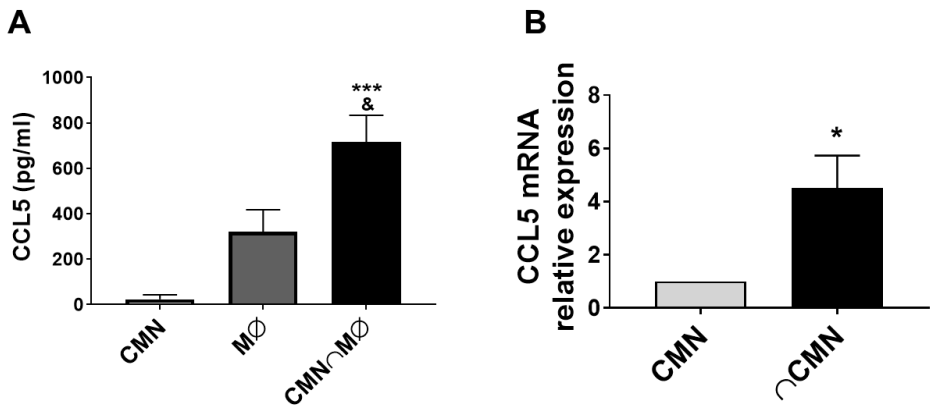


Figura 3 *Secreţia şi expresia CCL5 este crescută în CMN în urma interacţiei cu macrofagele.*

Activarea căilor de semnalizare MAPK (protein kinaze activate de mitogen) a fost demonstrată în ateroscleroză, fiind cunoscut faptul că ERK1/2, JNK şi p38 MAPK sunt activate în CMN implicate în procesul patologic (Pan et al., 2023). Astfel, în CMN interacţionate cu MØ, am analizat activarea căilor MAPK prin detecţia formelor fosforilate ale ERK1/2, JNK şi p38 prin tehnica Western Blot. Datele noastre au arătat că interacţia CMN-MØ induce activarea căii ERK1/2 în CMN după 6 ore de interacţie, demonstrată prin creşterea semnificativă (de 2,7 ori) a proteinei fosfo-ERK1/2, raportată la proteina totală ERK1/2; după 24 ore de interacţie cu macrofagele, calea ERK nu mai este activată în CMN.

Caspaza-1 este proteina efector a inflamazomului NLRP3, care clivează proforma citokinelor inflamatoare, generând forma lor activată, care este eliberată. În condiţiile noastre experimentale, NLRP3 nu este exprimat în CMN control sau interacţionate cu macrofage, deşi expresia proteică a IL-1β este semnificativ crescută, ceea ce confirmă datele noastre anterioare (Butoi et al., 2016). În schimb, expresia proteică a caspazei-1 este semnificativ crescută în CMN interacţionate timp de 24 ore cu macrofage.

Rezultatele obținute pe MØ în interacţia cu CMN au arătat o creştere a expresiei de MIP-1β (Figura 4) care se cunoaște că are un rol important în progresia bolii aterosclerotice şi vulnerabilitatea plăcii (Chang and Chen, 2016).

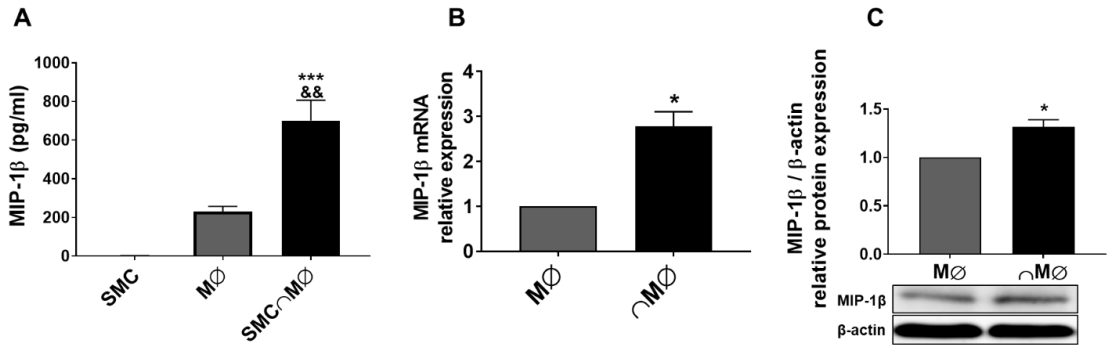


Figura 4 *Secreţia şi expresia MIP-1β este crescută în macrofage în urma interacţiei cu CMN.*

Ţinând cont de faptul că MIP-1β se găseşte la un nivel crescut în serul pacienţilor cu plăci aterosclerotice avansate şi este un predictor independent al evenimentelor cardiovasculare majore (Chang and Chen, 2016), datele noastre sugerează contribuţia importantă a comunicării dintre macrofage şi CMN în agravarea leziunii prin creşterea expresiei şi secreţiei de MIP-1β.

Căile de semnalizare activate în MØ în urma comunicării cu CMN sunt reprezentate de calea ERK1/2, însă nu se observă și activarea p38 și JNK MAPK. În plus a fost observată activarea inflamazomului NLRP3.

Aceste date contribuie la înţelegerea modului în care comunicarea între CMN şi macrofage amplifică procesul inflamator în placa aterosclerotică.

Al doilea capitol intitulat **- Diabetul accentuează remodelarea matricei extracelulare indusă de comunicarea celulelor musculare netede cu macrofagele -** evidențiază modularea enzimelor de remodelare a MEC – MMP – induse de comunicarea dintre CMN și MØ în condiții de glucoză crescută.

Rolul CMN în progresia aterosclerozei este complex, însă acesta este considerat în principal benefic, prin secreția de elemente de matrice, și în special de colagen de tip I, care poate stabiliza placa aterosclerotică formând un cap fibros. Pe de altă parte macrofagele au un efect opus, ele secretând o serie de enzime de remodelare a matricei care au un efect pro-trombotic prin subțierea acestui cap fibros.

Date obținute pe modele experimentale animale prin analiza histologică a regiunilor predispuse la rupere ale plăcii aterosclerotice, au arătat niveluri crescute de MMP-1, MMP-3 şi MMP-9 (Newby, 2005). Pierderea fibrelor de colagen și a altor componente ale MEC se

produce în regiunile cu o inflamație crescută în capul fibros. Studii recente au sugerat că plăcile aterosclerotice ale pacienților cu diabet de tip II sunt mai predispuse la rupere datorită creșterii inflamației vasculare și a răspunsului reparator ineficient (van Diepen et al., 2016, Edsfeldt et al., 2014). Totuși, moleculele cheie implicate în progresia plăcii spre o placă vulnerabilă la pacienții diabetici nu sunt cunoscute.

Datele din prezenta lucrare continuă studiile anterioare ale grupului nostru, unde am arătat că interacția dintre CMN și MØ produce o serie de molecule inflamatorii cum sunt MCP-1 și IL-1β, molecule care determină activarea macrofagelor și o modificare fenotipică a CMN caracterizată de expresia crescută a MMP-1, -2 și -9 și scăderea expresiei colagenului de tip I și III (Butoi et al., 2016). Silențierea CX3CR1, receptorul pentru fractalkină, a indus scăderea nivelului de MMP-9, sugerând implicarea acestuia în comunicarea celulară patologică (Butoi et al., 2011).

Folosind modelul *in vitro* de co-cultură stabilit anterior, am utilizat metode clasice de WB, protein array, qPCR, o metodă de vizualizare a asamblării de colagen dar și inhibatori farmacologici sau acid ribonucleic (ARN) de interferență pentru a determina contribuţia comunicării dintre macrofage şi CMN în progresia bolii aterosclerotice spre o placă vulnerabilă predispusă la ruptură.

Astfel, rezultatele prezentate în acest capitol au arătat că interacția CMN și MØ induce eliberarea în mediul condiţionat a unor proteaze cum sunt: ADAMTS1, MMP-1, MMP-3, MMP-9 şi urokinaza. Expresia proteică a MMP-1 și -9 este semnificativ crescută în CMN după co-cultură cu MAC umane derivate din monocite proaspăt izolate de la pacienți diabetici (ScDM) comparativ cu MAC control (ScCM). Pentru a determina efectul co-cultivării CMN cu MAC diabetice sau al concentraţiilor crescute de glucoză (HG) asupra MMP-urilor produse de CMN în urma interacţiei, ambele tipuri de MAC derivate de la donatori sănătoși (CM) sau de la pacienți diabetici (DM), au fost co-cultivate în condiții normale (NG) sau HG cu CMN. Se observă că MMP-9 a fost exprimat în CMN interacţionate cu CM în HG comparativ cu NG și de asemenea în CMN co-cultivate cu DM în HG comparativ cu NG, sugerând efectul glucozei crescute asupra expresiei MMP-9 (**Error! Reference source not found.**A). În plus, expresia MMP-9 este mai mare în CMN care au fost co-cultivate în HG cu DM comparativ cu CM, indicând faptul că MAC diabetice sunt responsabile pentru creșterea expresiei MMP-9. În cazul MMP-1, principala cauză a creșterii expresiei este concentrația crescută de glucoză, deoarece nu au fost obținute diferențe semnificative între expresia MMP-1 în CMN co-cultivate cu CM sau DM atunci când au fost expuse la condiții HG (Figura 5).

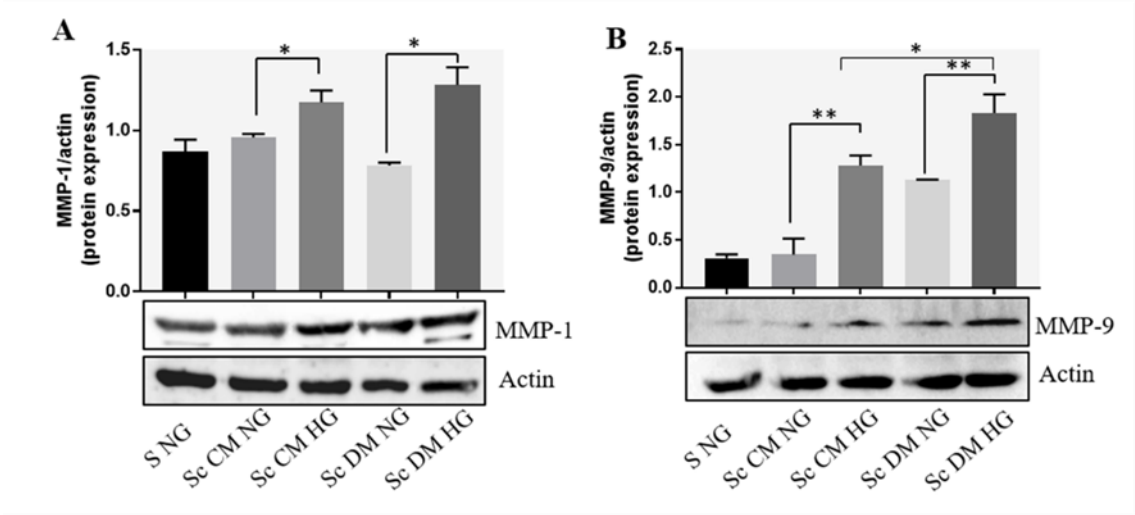


Figura 5 *Expresia proteică a MMP-1* ***(A)*** *şi MMP-9* ***(B)*** *în CMN în mediu cu concentraţii normale (NG) sau cresute (HG) de glucoză, neinteracţionate (S) sau interacţionate (Sc) cu macrofage diferenţiate din monocite izolate de la pacienţi control (CM) sau pacienţi diabetici (DM). Expresia proteică a MMP-1 şi MMP-9 a fost normalizată la expresia de β-actină, (Macarie et al, 2018, J.Cel.Mol.Med).*

Pentru a evidenția căile de semnalizare implicate în această creștere a enzimelor de remodelarea a MEC am realizat silențierea receptorului pentru MCP-1 – Ccr2 și a sub-unității p65 a NF-kB prin transfectarea CMN cu ARN de interferență înainte de co-cultivarea cu MØ. Aceste experimente (Figura 6) au arătat că expresia proteică a MMP-1 și MMP-9 a fost semnificativ redusă în CMN în care CCR2 și p65 au fost silenţiate. Nu a fost detectat niciun efect asupra expresiei MMP-urilor în CMN transfectate cu siRNA nespecific (control negativ).

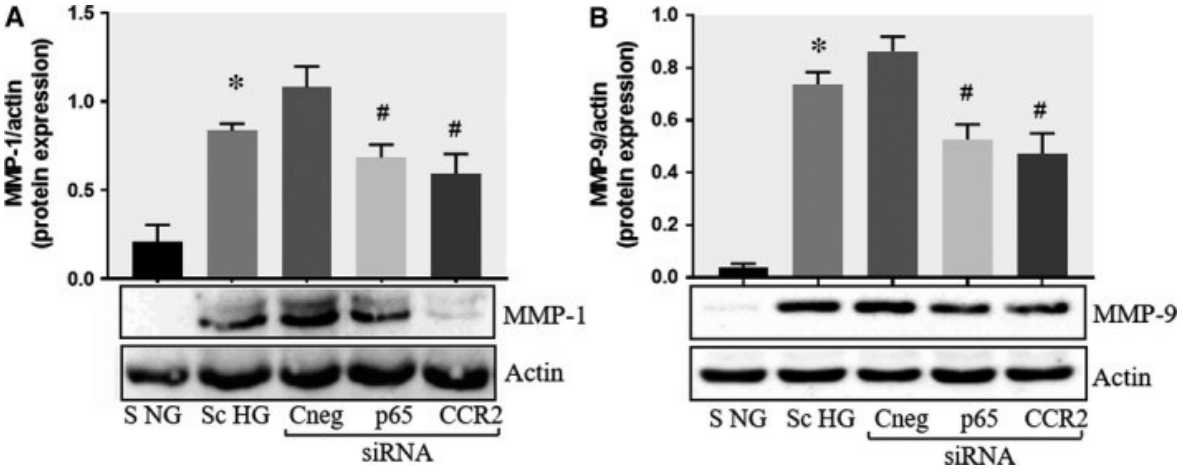


Figura 6 *Efectul silenţierii CCR2 şi p65 în reglarea expresiei MMP-1 şi MMP-9 în CMN. Expresia MMP-1 (A) şi MMP-9 (B) a fost determinată prin Western Blot în CMN control (S NG), CMN co-cultivate cu MØ în condiţii de glucoză crescută (Sc HG) şi CMN silenţiate pentru CCR2 şi p65, interacţionate cu MØ în condiţii de glucoză crescută (Cneg, p65, CCR2 siRNA). (Macarie et al, 2018, J.Cel.Mol.Med)*

Activarea protein kinazei C (PKC) este unul dintre evenimentele principale de semnalizare induse de concentrația crescută de glucoză. Pentru a examina posibila implicare a PKC în creșterea expresiei de MMP-1 și MMP-9, am evaluat activarea PKCα în CMN. După cum rezultă din experimentele de Western Blot, co-cultura CMN-MØ în condiții de glucoză crescută a indus o creștere semnificativă a fosforilării PKCα în CMN. Interesant, silențierea p65 sau CCR2 cu siRNA specific a împiedicat activarea PKCα.

Pentru a evalua dacă PKCα este implicată direct în expresia de MMP-1 și MMP-9, co-cultura dintre CMN-MØ a fost realizată în prezența inhibitorului de PKCα, Go 6976 (1 μmol/L). În acest caz, expresia proteică a ambelor proteaze, MMP-1 și MMP-9, a fost semnificativ redusă, sugerând că activarea PKCα este implicată în supraxpresia MMP-1 și MMP-9 (Figura 7).

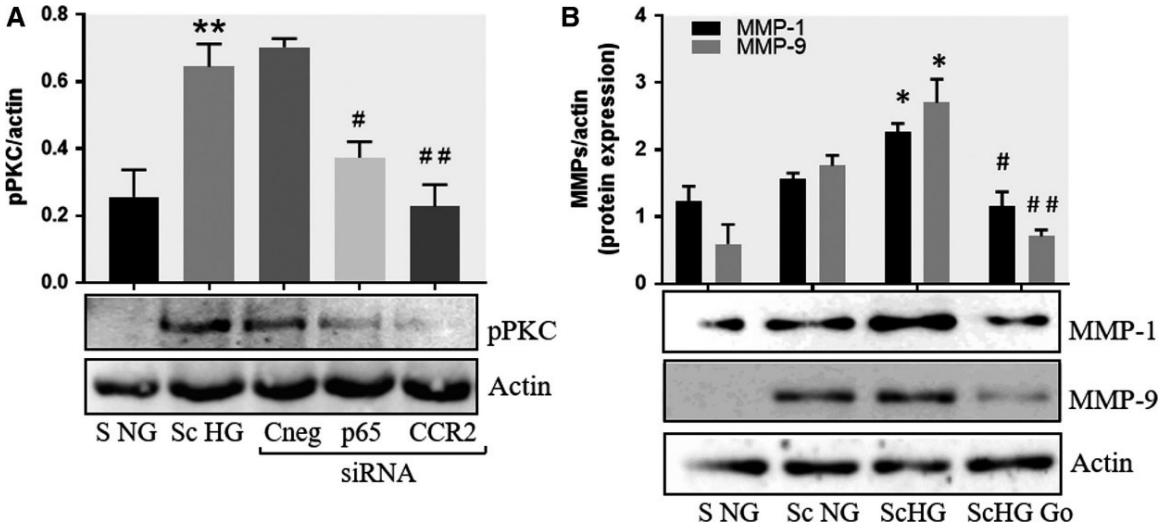


Figura 7 *Inhibarea PKCα scade expresia proteică a MMP-1 şi MMP-9 indusă de interacţia CMN cu MØ.* ***(A)*** *Evaluarea activării PKCα în CMN control (S NG) comparativ cu CMN co-cultivate cu MØ în condiţii de glucoză crescută (Sc HG). Forma fosforilată a PKCα este semnificativ crescută în Sc HG. Silenţierea CCR2 sau p65 scade activarea PKCα la nivelul controlului.* ***(B)*** *Efectul inhibitorului PKCα (Go 6976) asupra expresiei proteice de MMP-1 şi MMP-9 indusă de comunicarea CMN-MØ. (Macarie et al, 2018, J.Cel.Mol.Med)*

În continuare, am investigat dacă CMN activate de interacţia cu macrofagele îşi păstrează capacitatea de a forma fibrile de colagen, o caracteristică importantă în stabilitatea vasculară (Li et al., 2003). Pentru aceasta, colagenul solubilizat şi marcat cu Texas Red a fost adăugat în cultura de CMN control sau CMN după interacţia lor cu macrofage în condiţii de glucoză normală (NG) sau glucoză crescută (HG). Asamblarea fibrilelor de colagen a fost urmărită prin microscopie de fluorescenţă.

Rezultatele au aratat (Figura 8) că după interacţia cu MØ în condiţii normale sau crescute de glucoză, CMN îşi scad capacitatea de a asambla monomerii de colagen în fibre, comparativ cu CMN neinteracţionate, menţinute în mediu cu concentraţie normală de glucoză. Atunci când CMN interacţionate cu MØ în condiţii de glucoză crescută au fost preincubate pentru 3 minute cu anticorpi de blocare anti-MMP-1 sau anti-MMP-9, acestea şi-au recăpătat capacitatea de a asambla monomerii de colagen.

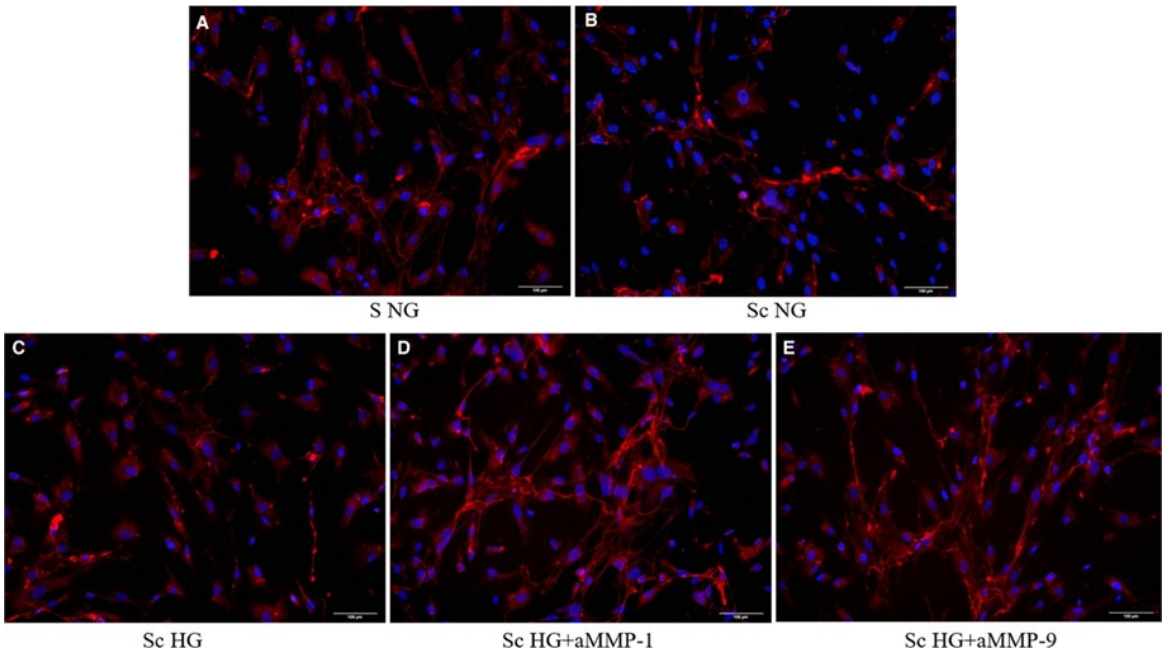


Figura 8 *Formarea fibrelor de colagen de către CMN, din colagen solubil marcat cu Texas Red. (Macarie et al, 2018, J.Cel.Mol.Med)*

Rezultatele acestor două capitole au vizat în principal ateroscleroza și au accentuat relevența comunicării intercelulare în procesele biologice, dar mai ales în condițiile patologice, unde echilibrul acestor interacțiuni poate fi complet dereglat. Astfel, am arătat că, macrofagele au un efect pro-inflamator și că CMN pot deveni la rândul lor mediatori ai inflamației locale conducând la cronicizarea inflamației. Totodată, concentrațiile crescute de glucoză modulează această interacțiune, determinând o secreție crescută a proteazelor matriceale și anomalii în procesul de asamblare a colagenului, modificări ce pot favoriza dezvoltarea unei plăci aterosclerotice susceptibilă la rupere.

Capitolul 3 - Diabetul timpuriu induce remodelarea matricei și modificări funcționale în valva aortică într-un model murin de ateroscleroză și într-un model de cultură celulară tridimensională - a avut ca obiectiv principal studiul bolii valvei aortice și a modificărilor MEC induse de diabetul timpuriu.

Integritatea structurală a MEC este esențială pentru funcția normală a valvei aortice, iar modificări ale acesteia au fost observate în toate stadiile patogenezei BVA. Diabetul accelerează evoluția BVA și poate induce modificări ale MEC. Totuși, modificările MEC induse de diabet în etapele timpurii ale evoluției BVA nu au fost studiate.

Acest capitol a abordat două modele experimentale de studiu, unul *in vivo* reprezentat de un șoarece deficient în apolipoproteina E (ApoE), căruia i-a fost indus diabetul prin injecții cu streptozotocină și care a fost apoi menținut pe o dietă bogată în colesterol pentru inducerea aterosclerozei și a modificărilor la nivelul valvei aortice; și un model *in vitro*, reprezentat de un model tridimensional de co-cultură bazat pe un hidrogel din gelatină metacrilată în care au fost înglobate celule valvulare umane și care a fost expus la concentrații crescute de glucoză. Metodele folosite în acest capitol au inclus: imunofluorescența, izolarea de celule primare valvulare umane, WB și qPCR.

Rezultatele acestui capitol 3 au arătat că *in vivo* diabetul experimental induce modificări ale elementelor de matrice și a enzimelor de remodelare cum ar fi colagenul 3, fibronectina, MMP-2 și MMP-9 (Figura 9).

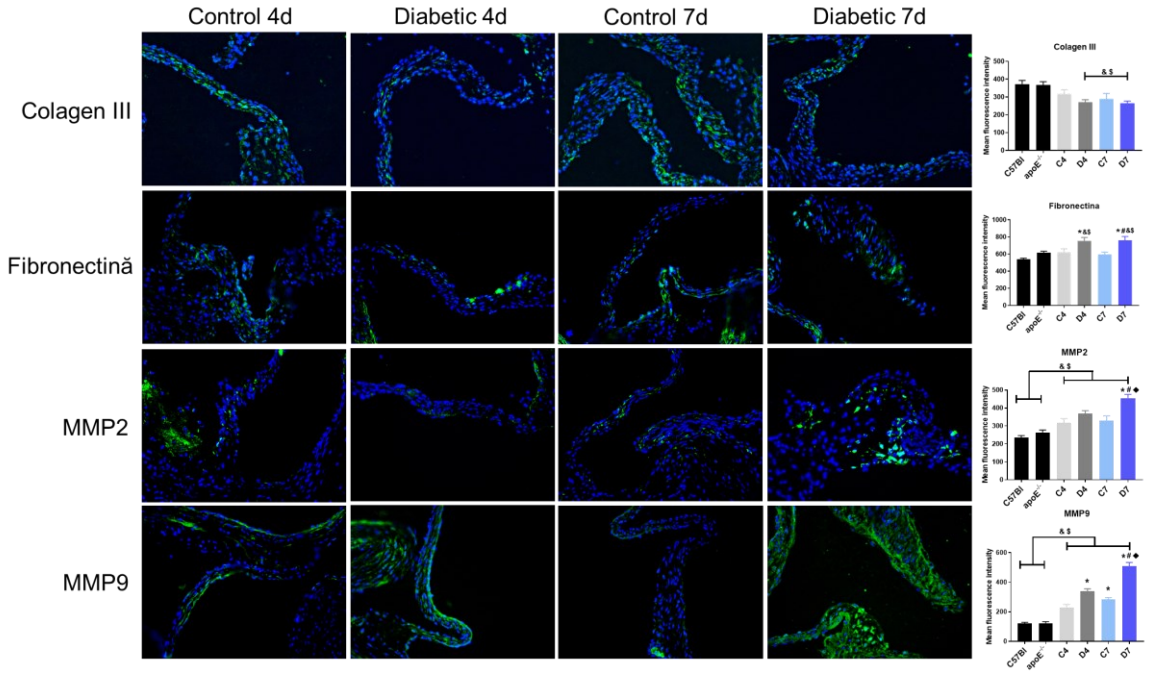


Figura 9 *Expresia proteică a proteinelor de matrice extracelulară: colagen III și fibronectină și a gelatinazelor MMP-2 și MMP-9. În dreapta imaginilor de imunofluorescență este analiza statistică a expresiei de MMP-2, -9, colagen III și fibronectină în grupurile de șoareci control și diabetici.*

Aceste modificări sunt corelate cu parametrii plasmatici și funcționali ai valvei aortice (Figura 10) astfel: nivelul crescut al MMP-9 se corelează pozitiv puternic cu parametrii plasmatici precum fetuina, trigliceride, colesterolul total și LDL, cu expresia markerului de miofibroblaste – αSMA, cu expresia unei alte metaloproteaze matriceale - MMP2 dar și cu parametrii funcționali ai valvei - velocitatea și VTI; fibronectina se asociază

pozitiv cu MMP-2 și MMP-9 și negativ cu colagenul III iar colagenul de tip III este corelat negativ cu αSMA, vimentina, MMP9, LDL și colesterolul total.

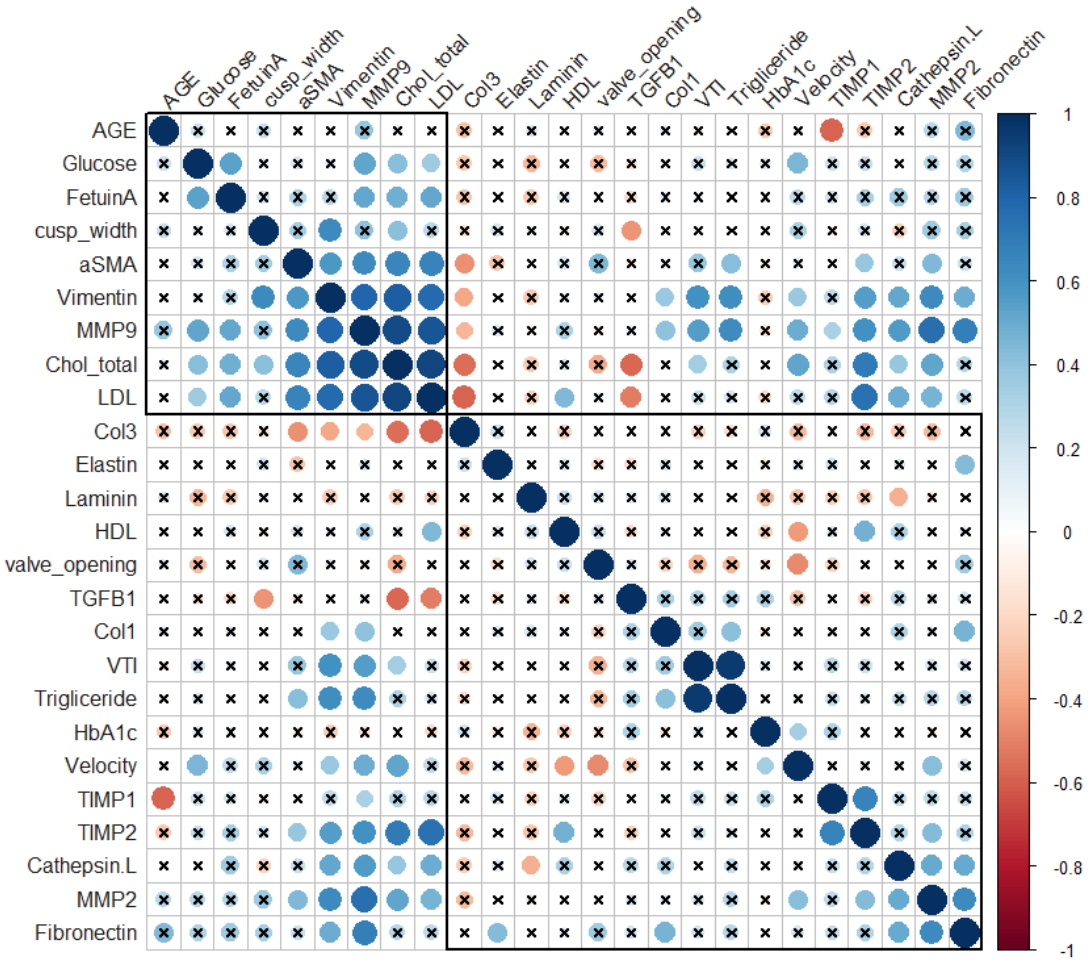


Figura 10 *Matricea corelațiilor Pearson dintre proteinele de matrice extracelulară, markerii de remodelare și parametrii funcționali și plasmatici ai valvei aortice. Valorile medii măsurate pentru fiecare grup experimental au fost utilizate pentru realizarea de corelații Pearson. Corelațiile pozitive sunt reprezentate prin culoarea albastru, corelațiile negative prin culoarea roșu iar paleta de culori din legendă indică coeficentul Pearson (r). Corelațiile care nu ating pragul de semnificație statistică (p > 0,05) sunt marcate cu un x (modificat după Țucureanu, et al., 2019).*

Pentru a identifica tipul celular afectat de condițiile hiperglicemice și pe cel responsabil de modificările observate asupra moleculelor asociate procesului de remodelare, studiul a continuat cu analiza efectelor glucozei asupra VEC și VIC într-un model 3D de foiță valvulară dezvoltat în laboratorul nostru (Vadana et al., 2020) și trimis spre brevetare. Modelul 3D dezvoltat în laboratorul nostru este obținut din hidrogel (gelatină metacrilată) și

are următoarele avantaje: i) respectă structura foiței valvulare native având VEC la exterior și VIC încapsulate în interior, și ii) celulele valvulare crescute în acest model sunt umane, ceea ce îi conferă o relevanță deosebită în ceea ce privește rezultatele obținute cu ajutorul lui.

Rezultatele obținute pe acest model au evidențiat modificări celulare specifice ale enzimelor de remodelare a MEC (Figura 11A) și ale receptorilor transmembranari care realizează legătura dintre celule și MEC (Figura 11B).

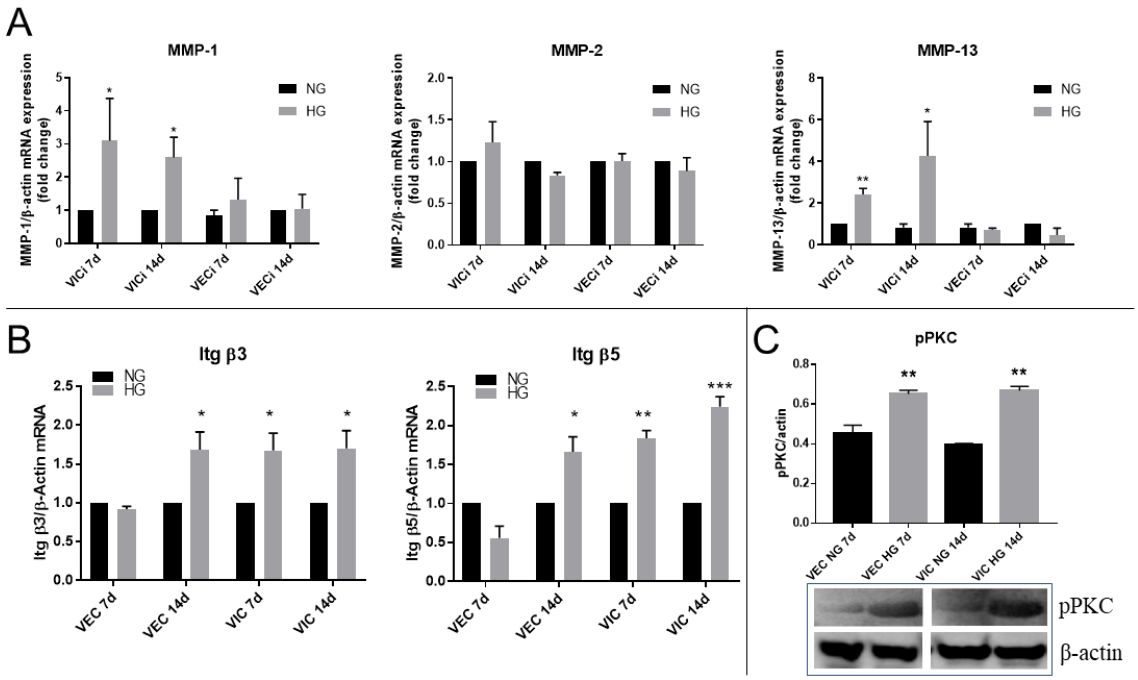


Figura 11 A. *Expresia genică a MMP-1, -2 și -13 în celulele valvulare (VEC și VIC) în modelul 3D expus la concentrații de glucoză normală (NG) sau crescută (HG) timp de 7 și 14 zile.* ***B.*** *Expresia genică a subunităților integrinice β3 și β5 în VEC și VIC din modelul 3D expus la concentrații de glucoză normală (NG) sau crescută (HG) timp de 7 și 14 zile. Celulele au fost izolate din construcții 3D după 7 și 14 zile și investigate prin reacția qPCR.* ***C.*** *Expresia formelor fosforilate ale PKC în VEC și VIC izolate din modelul 3D de valvă aortică. Western blot a fost realizat pe lizatul de celule valvulare izolate din constructul 3D după 7 și 14 zile de expunere la glucoză. În comparație cu NG (coloane negre), celulele din HG (coloane gri) prezintă o expresie crescută a pPKC-α. N = 3, ** p < 0,01.*

Studii anterioare au arătat că PKC reglează expresia MMP-1, în acest capitol, am arătat că forma activă, fosforilată a acesteia este crescută în VIC și VEC din condițiile hiperglicemice (Figura 11C).

Rezultatele din acest capitol contribuie la înțelegerea patologiilor valvulare în condiții de diabet timpuriu și pot deschide căi de cercetare pentru dezvoltarea de terapii țintite pentru prevenirea sau atenuarea progresiei BVA.

Capitolul 4 numit - **Analiza bioinformatică a comunicării dintre celulele valvulare într-un model de șoarece deficient in Apoe** - a avut ca obiectiv principal determinarea unor mediatori ai comunicării intercelulare care pot să inducă modificarea elementelor de MEC observate în celulele interstițiale valvulare, celulele predominante în țesutul valvular, într-un model de șoarece $ApoE^{-/-}$.

Acest capitol abordează metode de analiză bioinformatică a unor date de secvențiere de nouă generație la nivel unicelular (scRNA-seq) obținute și publicate în 2021 (Lee et al., 2022). Acest tip de secvențiere permite observarea heterogenității celulare și totodată permite explorarea interacțiunilor funcționale dintre sub-populațiile celulare din valvă.

Metodele bioinformatice au presupus procesarea și analiza datelor de sc-RNAseq utilizând pachetul informatic Seurat v4 (Hao et al., 2021) în limbajul de programare R. Urmată de o analiză de expresie genică diferențială, pentru sub-populațiile de celule identificate, între populațiile control și cele provenite de la șoareci $ApoE^{-/-}$.

Analiza datelor de scRNA-seq a demonstrat existența a 14 populații de celule valvulare din care 3 sub-populații reprezintă celule valvulare interstițiale (Figura 12).

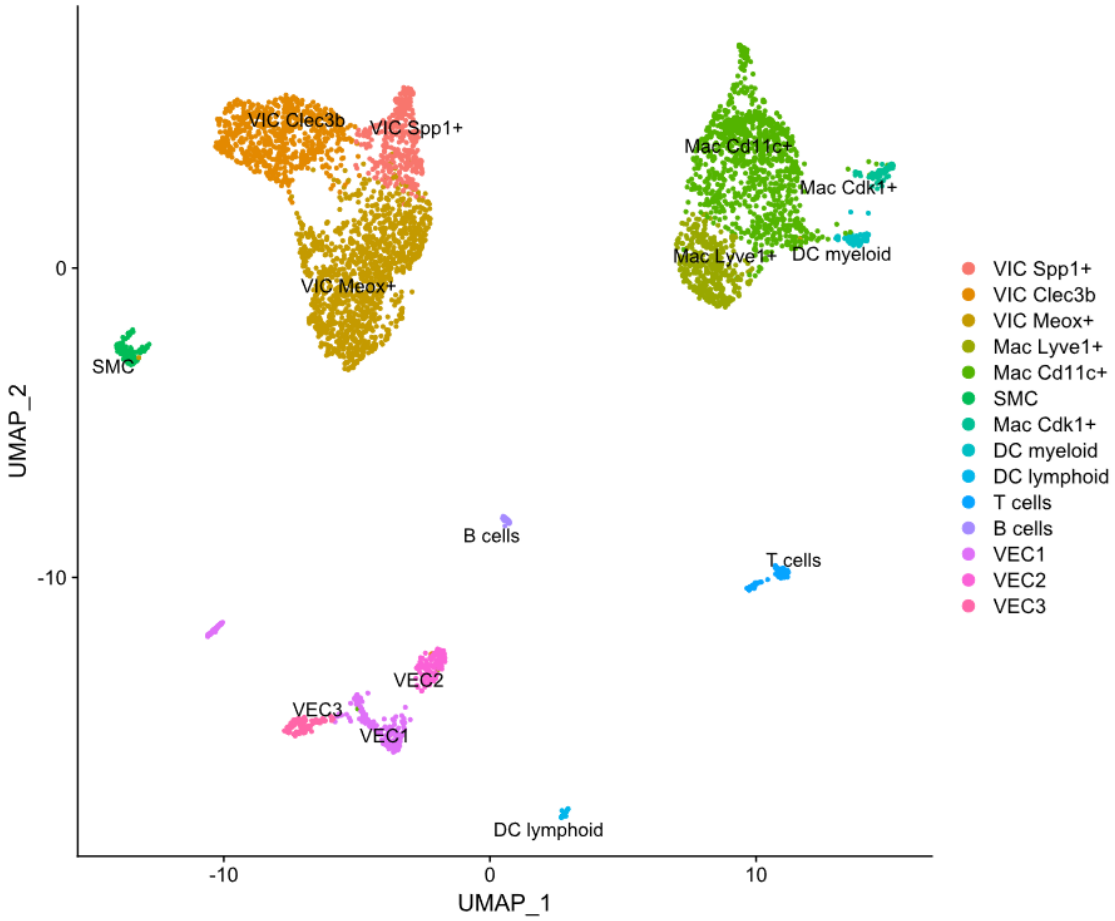


Figura 12 *Proiecția UMAP care surprinde structura datelor de sc-RNAseq și relația dintre cele 14 grupuri de celule valvulare.*

Dintre aceste grupuri de VIC, o sub-populație caracterizată printr-o expresie crescută a osteopontinei, prezintă modificări importante ale genelor de MEC în hiperlipidemie, fiind observată creștrea genelor Col1a1, Col2a1, Col3a1, Fn1, Spp1 și a inhibitorului de MMP – Timp1 (Figura 13A). O analiză de tip GSEA a tuturor genelor modificate semnificativ în acest grup (Figura 13B) a arătat că majoritatea genelor modificate în hiperlipidemie sunt gene prezente în spațiul extracelular și sunt implicate în organizarea fibrelor de colagen sau a matricei extracelulare.

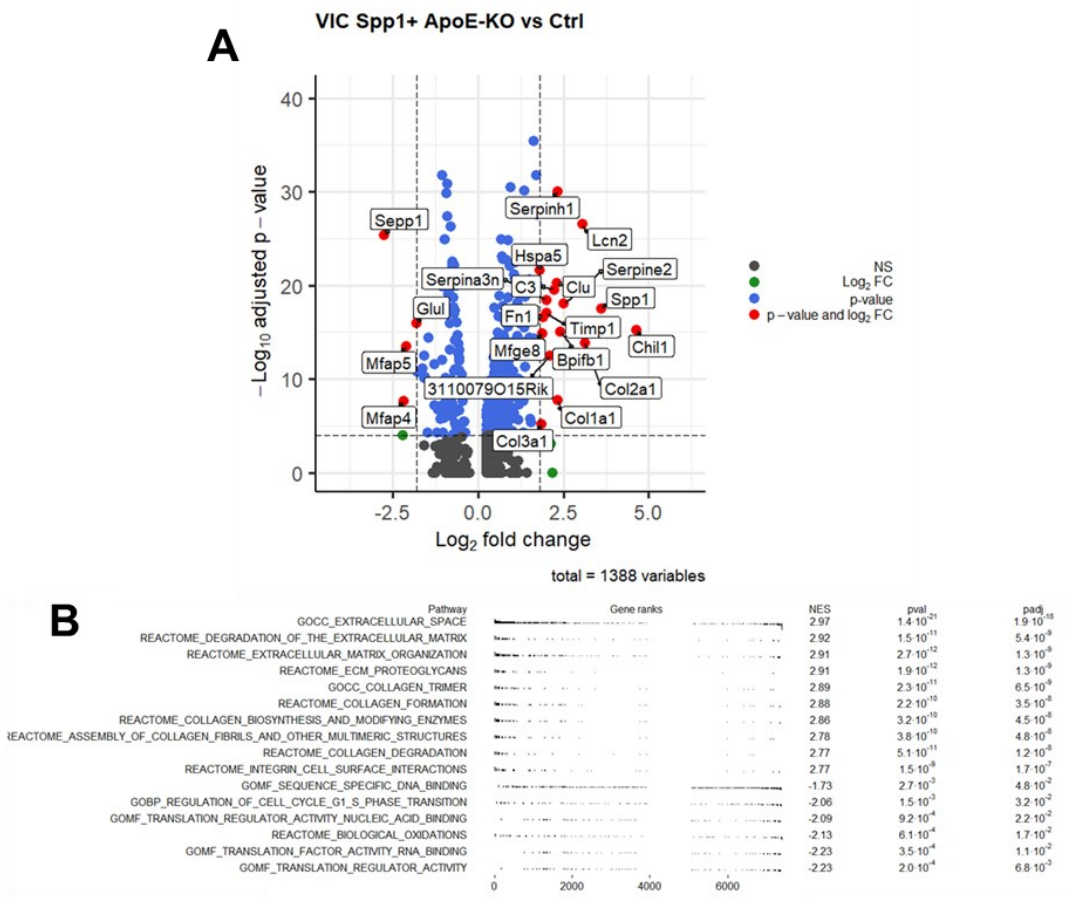


Figura 13 A. *Analiza diferențială a expresiei genelor din VIC Spp1^{+} între condiția Apoe$^{-/-}$ și control. În volcano plot, gri definește genele nemodificate; albastru - genele care trec de pragul valorii p; verde – genele care trec pragul Log2FC dar nu și pe cel al valorii p; iar genele roșii sunt genele semnificativ modificate care îndeplinesc ambele condiții. Pragul de semnificație a fost de p≤10^-5 și Log2FC= 1,8; iar testul statistic folosit a fost Wilcoxon rank sum.* ***B.*** *Cele mai îmbogățite seturi de gene pentru VIC Spp1^{+} modificate semnificativ în condiția Apoe$^{-/-}$, ordonate după scorul normalizat de îmbogățire (NES).*

Pentru a observa ce mediatori ai comunicării intercelulare valvulare pot determina modificările observate în grupul de VIC Spp1^{+} am utilizat o metodă computațională de modelare a comunicării intercelulare utilizând pachetul informatic NicheNet (Browaeys et al., 2020). Acest pachet integrează informațiile experimentale de sc-RNAseq cu baze de date care conțin informații despre interacțiunile ligand-receptor, semnalizare intracelulară și reglarea transcrierii, ceea ce permite evidențierea unor noi mediatori ai semnalizării și a comunicării inter-celulare în procesele patologice.

Această analiză sumarizată în Figura 14 a stabilit o serie de potențiali liganzi cu potențial reglator pentru acest cluster VIC Spp1^{+}.

Figura 14 Sumarizarea analizei de bioinformatică a comunicării intercelulare realizată cu ajutorul pachetului Nichenet. A) Primii 40 de liganzi rezultați în urma analizei de activitate a liganzilor ordonați în funcție de aria de sub curba de precizie-recuperare (AUPR). **B)** Expresia relativă și procentul de celule care exprimă cei 40 de liganzi calculată pentru fiecare grup de celule valvulare. Mărimea punctelor este direct proporțională cu procentul de celule care exprimă respectivul ligand în fiecare grup, iar roșul definește o expresie mai crescută comparativ cu expresia medie a acelui ligand, în timp ce albastru definește o expresie relativă mai scăzută. C) Modificarea expresiei genice a liganzilor în șoarecele $Apoe^{-/-}$. Cu roșu este reprezentată o creștere a expresiei genice în $Apoe^{-/-}$ comparativ cu controlul, iar cu albastru scăderea expresiei genice. D) Genele țintă exprimate în VIC $Spp1^{+}$ și modificate în $Apoe^{-/-}$ pe care fiecare ligand îl poate modifica. Cu mov este calculat un potențial reglator bazat de informațiile ligand-țintă prezente în modelul NicheNet.

Liganzii cu cel mai mare potențial reglator sunt reprezentați de IL-1β, FGF-2, TGF-β1, BMP-4 și CSF2 (Figura 15). Dintre liganzii identificați, TGF- β1 este exprimat în principal de VIC dar și de macrofagele CD11c+, BMP-4 este exprimat în principal de celulele valvulare endoteliale, iar IL-1β este exprimat de celulele dendritice și macrofagele Cd11c+, iar macrofagele proinflamatoare pot comunica și induce modificări în VIC Spp1+ prin secreția de Il1b, Lgals3, Tgf-β1. Dintre acestea atât Lgals3 cât și Il1b prezintă o creștere a expresiei în hiperlipidemie.

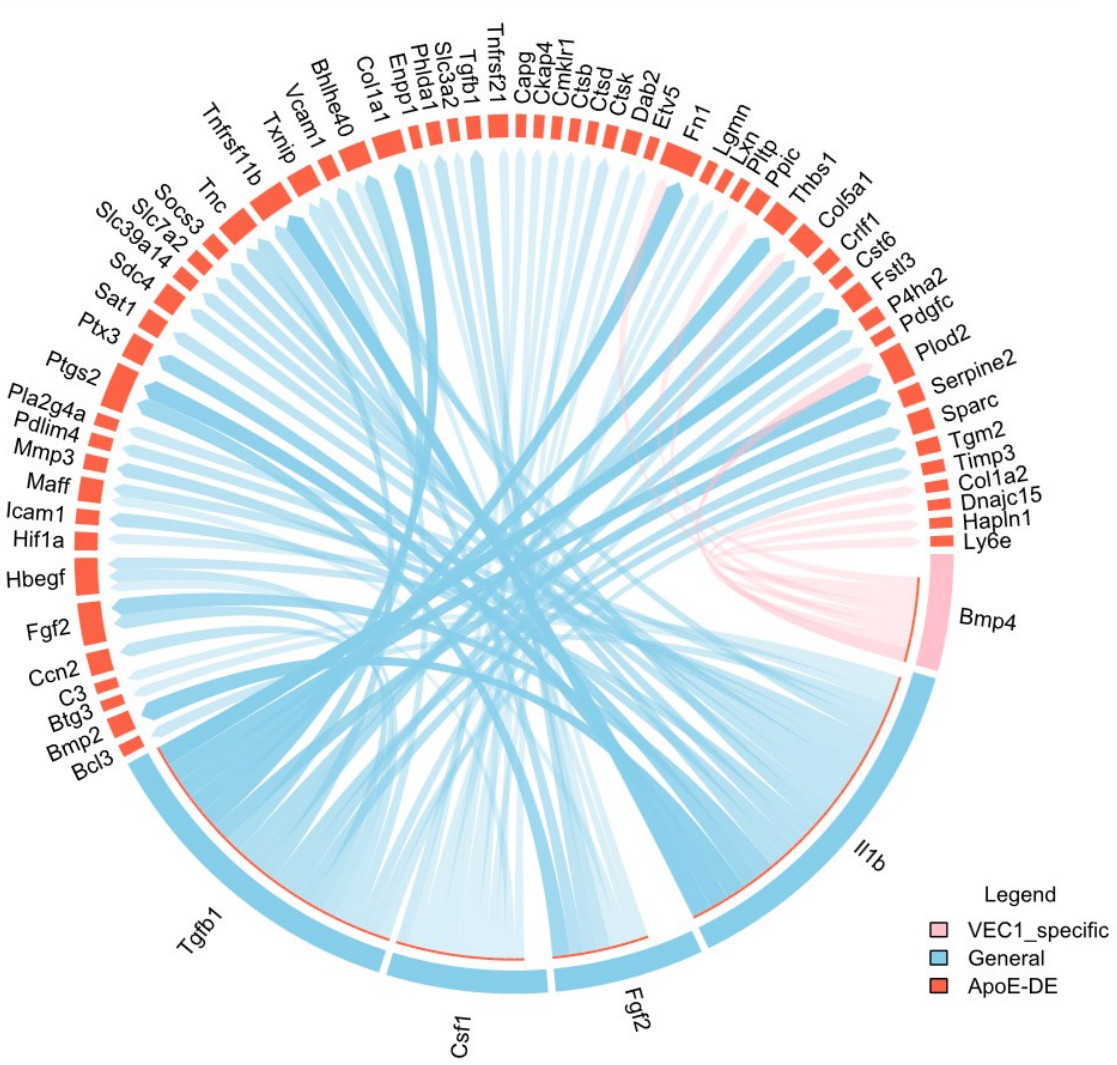


Figura 15 Reprezentarea grafică circulară a liganzilor cu cel mai puternic potențial reglator și genele lor țintă. În partea de jos marcați cu albastru sunt liganzii (Tgfb1, Csf1, Fgf2 și Il1b) care nu sunt exprimați doar de un singur tip celular specific; cu roz este marcat Bmp4 care este exprimat doar în grupul VEC; iar în partea de sus a graficului și marcat cu portocaliu sunt reprezentate genele țintă pentru fiecare ligand.

În concluzie, această lucrare aduce contribuții semnificative pentru înțelegerea modificărilor patologice ale matricei extracelulare, care survin în contextul aterosclerozei și a BVA, utilizând tehnici de cercetare complexe.

În primul capitol am evidențiat noi mecanisme prin care comunicarea dintre celulele musculare netede și macrofage poate influența evoluția ateromului către o placă vulnerabilă prin amplificarea inflamației determinată de creșterea mediatorilor inflamatorii: G-CSF, GM-CSF, ICAM-1, IL-6, CCL5 și MIP-1β. Am arătat și că această inflamație este dependentă de activarea inflamazomului NLRP3 și a căii de semnalizare ERK/MAPK.

În cel de-al doilea capitol am urmărit efectul glucozei crescute în amplificarea remodelării matriceale și am demonstrat că expresia și activitatea enzimelor de remodelare a matricei extracelulare: MMP-3, -8, -1 și -9 este crescută în condiții de glucoză crescută iar aceste modificări sunt modulate de semnalizarea prin prin PKCα și de semnalizarea prin receptorul CCR2.

În cel de-al treilea capitol am identificat modificări ale matricei extracelulare valvulare într-un model de șoarece $Apoe^{-/-}$ diabetic la o perioada scurtă de 4 și 7 zile de la declanșarea diabetului, înainte de fibroza și calcificarea valvei. Utilizând acest model experimental am arătat că expresia fibronectinei și a metaloproteazelor MMP-2 și -9 este crescută la acești șoareco iar aceste modificări se corelează pozitiv cu parametrii plasmatici și funcționali ai valvei. Dorind să investighez modificările induse de diabet la nivel celular, experimentele din capitolul 3 au fost continuate pe un model de studiu *in vitro* tri-dimensional cu VIC la interior și VEC la exterior care a fost menținut în glucoză crescută timp de 7 și 14 zile. Rezultatele obținute pe acest model au arătat că glucoza crescută determină modificări ale expresiei genice de laminină gamma, collagen de tip III, a enzimelor MMP-1 și MMP-13 și a subunităților integrinice β3 și β5 în VIC, iar în VEC crește expresia genică a subunităților integrinice α4, αV și β.

Cel de-al patrulea capitol a presupus o analiză complexă a unor date de secvențiere a ARN la nivel unicelular a valvei aortice provenite de la șoareci C57BL/6J și $Apoe^{-/-}$. Prin această analiză am identificat existența unei sub-populații de VIC care suferă modificări semnificative ale genelor MEC în hiperlipidemie. Modelarea bioinformatică a comunicării intercelulare în valvă a arătat că aceste modificări pot fi mediate de: IL-1β, FGF-2, TGF- β1, BMP-4 și CSF2.

Investigarea modificărilor MEC induse și de efectul diabetului, surprinde un domeniu de studiu în care contribuțiile științifice sunt încă reduse.

Datele prezentului studiu reprezintă un avans important în acest domeniu furnizând perspective noi privind modalitatea prin care remodelarea MEC afectează progresia BVA și a leziunilor aterosclerotice. În plus, aceste date pot ajuta la dezvoltarea de abordări terapeutice noi, centrate pe țintirea comunicării intercelulare și ameliorarea remodelării patologice a MEC.

Bibliografie

BROWAEYS, R., SAELENS, W. & SAEYS, Y. 2020. NicheNet: modeling intercellular communication by linking ligands to target genes. *Nat Methods,* 17**,** 159-162.

BUTOI, E., GAN, A. M., TUCUREANU, M. M., STAN, D., MACARIE, R. D., CONSTANTINESCU, C., CALIN, M., SIMIONESCU, M. & MANDUTEANU, I. 2016. Cross-talk between macrophages and smooth muscle cells impairs collagen and metalloprotease synthesis and promotes angiogenesis. *Biochim Biophys Acta,* 1863**,** 1568-78.

BUTOI, E. D., GAN, A. M., MANDUTEANU, I., STAN, D., CALIN, M., PIRVULESCU, M., KOENEN, R. R., WEBER, C. & SIMIONESCU, M. 2011. Cross talk between smooth muscle cells and monocytes/activated monocytes via CX3CL1/CX3CR1 axis augments expression of pro-atherogenic molecules. *Biochim Biophys Acta,* 1813**,** 2026-35.

CHANG, T. T. & CHEN, J. W. 2016. Emerging role of chemokine CC motif ligand 4 related mechanisms in diabetes mellitus and cardiovascular disease: friends or foes? *Cardiovasc Diabetol,* 15**,** 117.

COFFEY, S., ROBERTS-THOMSON, R., BROWN, A., CARAPETIS, J., CHEN, M., ENRIQUEZ-SARANO, M., ZUHLKE, L. & PRENDERGAST, B. D. 2021. Global epidemiology of valvular heart disease. *Nat Rev Cardiol,* 18**,** 853-864.

EDSFELDT, A., GONCALVES, I., GRUFMAN, H., NITULESCU, M., DUNER, P., BENGTSSON, E., MOLLET, I. G., PERSSON, A., NILSSON, M., ORHO-MELANDER, M., MELANDER, O., BJORKBACKA, H. & NILSSON, J. 2014. Impaired fibrous repair: a possible contributor to atherosclerotic plaque vulnerability in patients with type II diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 34**,** 2143-50.

HAO, Y., HAO, S., ANDERSEN-NISSEN, E., MAUCK, W. M., 3RD, ZHENG, S., BUTLER, A., LEE, M. J., WILK, A. J., DARBY, C., ZAGER, M., HOFFMAN, P., STOECKIUS, M., PAPALEXI, E., MIMITOU, E. P., JAIN, J., SRIVASTAVA, A., STUART, T., FLEMING, L. M., YEUNG, B., ROGERS, A. J., MCELRATH, J. M., BLISH, C. A., GOTTARDO, R., SMIBERT, P. & SATIJA, R. 2021. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell,* 184**,** 3573-3587 e29.

KATAKAMI, N. 2018. Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis,* 25**,** 27-39.

LEE, S. H., KIM, N., KIM, M., WOO, S.-H., HAN, I., PARK, J., KIM, K., PARK, K. S., KIM, K., SHIM, D., PARK, S.-E., ZHANG, J. Y., GO, D.-M., KIM, D.-Y., YOON, W. K., LEE, S.-P., CHUNG, J., KIM, K.-W., PARK, J. H., LEE, S. H., LEE, S., ANN, S.-J., LEE, S.-H., AHN, H.-S., JEONG, S. C., KIM, T. K., OH, G. T., PARK, W.-Y., LEE, H.-O. & CHOI, J.-H. 2022. Single-cell transcriptomics reveal cellular diversity of aortic valve and the immunomodulation by PPARγ during hyperlipidemia. *Nature Communications,* 13**,** 5461.

LI, S., VAN DEN DIEPSTRATEN, C., D'SOUZA, S. J., CHAN, B. M. & PICKERING, J. G. 2003. Vascular smooth muscle cells orchestrate the assembly of type I collagen via alpha2beta1 integrin, RhoA, and fibronectin polymerization. *Am J Pathol,* 163**,** 1045-56.

LIU, H., NING, H., MEN, H., HOU, R., FU, M., ZHANG, H. & LIU, J. 2012. Regulation of CCL5 expression in smooth muscle cells following arterial injury. *PLoS One,* 7**,** e30873.

MANDUTEANU, I. & SIMIONESCU, M. 2012. Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders? *J Cell Mol Med,* 16**,** 1978-90.

MONCLA, L.-H. M., BRIEND, M., BOSSÉ, Y. & MATHIEU, P. 2023. Calcific aortic valve disease: mechanisms, prevention and treatment. *Nature Reviews Cardiology,* 20**,** 546-559.

NEWBY, A. C. 2005. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev,* 85**,** 1-31.

ORGANIZATION, W. H. 9 December 2020. *The top 10 causes of death* [Online]. https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death: WHO. Available: https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death [Accessed 2022].

PAN, H., HO, S. E., XUE, C., CUI, J., ROSS, L. S., LI, F., SOLOMON, R. A., CONNOLLY, E. S. & REILLY, M. P. 2023. Atherosclerosis is a smooth muscle cell-driven tumor-like disease. *bioRxiv*.

SILVA, A. C., PEREIRA, C., FONSECA, A., PINTO-DO, O. P. & NASCIMENTO, D. S. 2020. Bearing My Heart: The Role of Extracellular Matrix on Cardiac Development, Homeostasis, and Injury Response. *Front Cell Dev Biol,* 8**,** 621644.

TEDGUI, A. & MALLAT, Z. 2006. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev,* 86**,** 515-81.

THIRIET, M. 2018. Cardiovascular Disease: An Introduction. *In:* THIRIET, M. (ed.) *Vasculopathies: Behavioral, Chemical, Environmental, and Genetic Factors.* Cham: Springer International Publishing.

TUCUREANU, M. M., BUTOI, E., GAN, A. M., STAN, D., CONSTANTINESCU, C. A., CALIN, M., SIMIONESCU, M. & MANDUTEANU, I. 2016. Amendment of the cytokine profile in macrophages subsequent to their interaction with smooth muscle cells: Differential modulation by fractalkine and resistin. *Cytokine,* 83**,** 250-261.

VAN DIEPEN, J. A., THIEM, K., STIENSTRA, R., RIKSEN, N. P., TACK, C. J. & NETEA, M. G. 2016. Diabetes propels the risk for cardiovascular disease: sweet monocytes becoming aggressive? *Cell Mol Life Sci,* 73**,** 4675-4684.

WOLF, D. & LEY, K. 2019. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res,* 124**,** 315-327.

Academia Română
Institutul de Biologie şi Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"

TEZĂ DE DOCTORAT

Mecanisme epigenetice implicate în diferențierea celulelor stem

Rezumat

Conducător științific:
Acad. Maya Simionescu

Doctorand
Iordache Florin

București
2013

Cuprins

INTRODUCERE

PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTINȚELOR

CAPITOLUL I.1 Celule progenitoare endoteliale.....6

I.1.1 Definiția și caracteristicile celulelor stem.....6

I.1.2 Clasificare și tipuri de celule stem.....8

I.1.3 Celulele progenitoare endoteliale prezente în sângele din cordon ombilical.....18

I.1.4 Aplicațiile clinice ale celulelor progenitoare endoteliale în patologia cardiovasculară.....22

CAPITOLUL I.2 Mecanisme epigenetice și rolul lor în diferențierea celulelor stem.....26

I.2.1 Definiția și caracteristicile modificărilor epigenetice.....31

I.2.2 Clasificarea și tipurile de modificări epigenetice.....32

I.2.2.1 Metilarea ADN.....32

I.2.2.2 Modificări ale histonelor.....34

a. Metilarea

b. Acetilarea

c. Fosforilarea

d. Sumoilarea

e. Ubiquitinilarea

f. Izomerizarea prolinei

g. ADP-ribozilarea

h. Deiminarea

I.2.2.3 microARN.....47

CAPITOLUL I.3 Mecanismele acetilării histonelor şi rolul lor în diferenţierea celulelor stem.....57
I.3.1 Definiţia şi caracteristicile acetilării.....57
I.3.2 Clasificarea enzimelor implicate în acetilare: 59
I.3.2.1 Histon-acetiltransferaze (HAT).....60
I.3.2.2 Histon-deacetilaze (HDAC).....65
I.3.3 Mecanismele de acţiune ale acetilării proteinelor histonice şi nonhistonice.....72
I.3.4 Rolul acetilării în diferenţierea celulelor stem.....78

PARTEA a II-a CONTRIBUŢII ORIGINALE.....84
II.1 Scop şi obiective.....84
II.2 Materiale şi metode.....86
II.3 Rezultate şi discuţii.....106
II.3.1 Izolarea şi caracterizarea celulelor progenitoare endoteliale din sângele din cordon ombilical.....106
II.3.2 Investigarea nivelului de acetilare al histonelor din celulele progenitoare endoteliale.....119
II.3.3 Efectul acetilării histonelor asupra diferenţierii celulelor progenitoare endoteliale.....125
II.3.4 Analiza acetilării unor factori transcripţionali implicaţi în morfogeneza cardiovasculară.....129
II.3.5 Influenţa acetilării histonelor asupra procesului de neovascularizaţie *in vitro*.....131
II. 4. Concluzii generale.....145
Bibliografie.....148
Diseminarea rezultatelor obţinute în cadrul tezei de doctorat.....172
Finanţarea cercetărilor.....178

Cuvinte cheie

Acetilare

Histone

Cromatină

Epigenetică

Celule stem

Celule progenitoare endototeliale

Celule stem fetale

Diferențiere

Neovascularizație

Boli cardiovasculare

Importanța studiului

Înțelegerea mecanismelor care conduc la diferențierea celulelor stem este scopul principal al numeroaselor studii. Accesibilitatea ADN-ului pentru factorii de transcripție depinde de structura cromatinei și gradul său de compactare. Analizele recente ale modificărilor epigenetice de la nivelul celulelor stem umane și murine au furnizat noi date despre proprietățile de pluripotență ale celulelor stem și a capacității lor de diferențiere. Aceste mecanisme determină o ierarhie a transcrierii, sunt mediate de factori de transcripție și sunt menite să controleze expresia genelor fără să altereze structura ADN. Capacitatea de multipotența a celulelor stem se reduce în timp, datorită represiei anumitor gene care prezintă o ”semnătură” epigenetică. Genele active la nivelul celulelor stem sunt silențiate gradat pe măsura trecerii lor în celule progenitoare, iar un alt subset de gene țesut-specifice sunt activate. Această progresie este realizată prin expresia selectivă a factorilor de transcripție care recunosc și interacționează cu diferitele modificări epigenetice de la nivelul cromatinei. Ca rezultat al acestor evenimente, cromatina devine accesibilă pentru transcriere la nivelul anumitor regiuni, permițând un control spațial și temporal necesar diferențierii celulelor stem. De exemplu, proteina HP1 (heterochromatine protein 1) își schimbă distribuția, de la o localizare dispersată la nivelul celulelor stem embrionare la o acumulare mult mai concentrată în loci distincți în timpul diferențierii celulare. Acetilarea histonelor era văzută ca un fenomen corelat cu o conformație deschisă a cromatinei, ce permitea exprimarea diferitelor gene implicate în diferențiere. În prezent s-a observat că, în stare acetilată, numeroase gene sunt represate și astfel, diferențierea spre o anumită linie celulară este blocată, menținându-se starea de pluripotență. Manipularea activității histon-deacetilazelor ar putea deveni un instrument util pentru a genera populații de celulele specifice în scopul utilizarii lor în transplant. Descoperirea modelelor de acetilare („*acetylation signature”*) implicate în diferențierea celulelor stem către diferitele tipuri celulare, deschide noi oportunități la interfața dintre chimie și biologia celulei stem, și poate oferi informații valoroase pentru a imbunătăți aplicațiile celulelor stem în ingineria tisulară și medicina regenerativă.

În acest context**, scopul tezei** este investigarea rolului acetilării histonelor în diferențierea celulelor progenitoare endoteliale prin analiza expresiei diferiților markeri genetici și a factorilor de transcripție care reglează activitatea acestor gene. De asemenea, studiile investighează efectul acetilării celulelor progenitoare endoteliale asupra procesului de neovascularizație *in vitro*.

Teza este structurată în două părți principale: partea I – Stadiul actual al cunoștințelor și partea a II-a - Contribuții originale.

Prima parte prezintă stadiul actual al cunoștințelor si este organizată în 3 subcapitole.

Subcapitolul I prezintă noțiuni legate de caracteristicile și proprietățile celulelor stem. În acest subcapitol este prezentat modelul celular utilizat, reprezentat de celulele progenitoare endoteliale și posibilele aplicații clinice ale acestora.

Subcapitolul II face o trecere în revista a principalelor modificări epigenetice. Sunt descrise mecanismele de acțiune a acestor modificări și enzimele implicate în realizarea lor. Tot în acest subcapitol este descris și rolul modificărilor epigenetice în diferențierea celulelor stem către diferite linii celulare.

Subcapitolul III descrie mecanismele acetilării histonelor și rolul lor în diferențierea celulelor stem. În acest subcapitol sunt prezentate principalele clase de histon-acetiltransferaze și histon-deacetilaze, mecanismele de acțiune ale acetilării histonelor, precum și influența acetilării în diferențierea celulelor progenitoare endoteliale.

În Partea a II a - "Contribuții originale", sunt prezentate rezultatele obținute din experimentele care au avut ca scop investigarea rolului acetilării histonelor în diferențierea celulelor progenitoare endoteliale și asupra capacității de neovascularizație *in vitro*.

Capitolul II.2 - “Materiale și Metode“ descrie principalele materiale și tehnici utilizate în experimente, incluzând numeroase tehnici noi de biologie celulara și moleculară: Real-Time PCR, Western-Blot, citometrie în flux, microscopie electronică de transmisie și de baleaj, imunocitochimie și imunohistochimie, metode colorimetrice și fluorimetrice.

Capitolul II.3 - “Rezultate și discuții“ prezintă principalele rezultate originale, obținute în cadrul studiilor efectuate.

Rezultate si discutii

Înțelegerea mecanismelor care conduc la diferențierea celulelor stem este scopul principal al numeroaselor studii. Analizele recente ale modificărilor epigenetice de la nivelul celulelor stem umane și murine au furnizat noi date despre proprietățile de pluripotență ale celulelor stem și a capacității lor de diferențiere. Aceste mecanisme determină o ierarhie a transcrierii, sunt mediate de factori de transcripție și sunt menite să controleze expresia genelor fără să altereze structura ADN-ului. Acetilarea histonelor era văzută ca un fenomen corelat cu o conformație deschisă a cromatinei, care permitea o exprimare a diferitelor gene implicate în diferențiere.

În prezent s-a observat că, în stare acetilată, numeroase gene sunt represate şi astfel diferenţierea spre o anumită linie celulara este blocată, menţinându-se starea de pluripotenţă.

În lucrarea de faţă am demonstrat că sângele din cordon ombilical conţine o populaţie bogată de celule progenitoare endoteliale, având un profil imunofenotipic caracteristic: CD31, CD34, CD133, CD144, CD146, VEGFR2. Analiza moleculară a celulelor obţinute din sânge din cordon ombilical a arătat faptul că sunt exprimate la nivel genic atât gene implicate în morfogeneză cardiovasculară, ca genele pentru factorii de transcripţie GATA2, GATA3, GATA4, cât şi gene caracteristice celulelor endoteliale: CD31, VE-cadherin, VEGFR1, VEGFR2, vWF, CXCR4, Tie-2. Totodată, am arătat că celulele progenitoare endoteliale prezintă o capacitate de proliferare şi migrare superioară în comparaţie cu alte tipuri de celule stem. Aceste celule pot prelua LDL acetilat şi lectina *Ulex europaeus,* pot forma reţele vasculare, fapt ce demonstrează potenţialul lor în angiogeneză şi repararea vasculară. Acest lucru a fost confirmat folosind secţiuni ventriculare embrionare murine viabile sau supuse ischemiei, în care am arătat că celulele progenitoare endoteliale au capacitatea de a se integra şi a forma reţele vasculare. Rezultatele noastre au arătat că celulele progenitoare endoteliale formează structuri vasculare doar la nivelul secţiunilor ventriculare embrionare murine viabile, în timp ce cele ischemice aceste celule doar se integrează, fapt ce demonstrează o comunicare directă intercelulară.

Rezultatele obţinute au arătat că acetiliarea inhibă diferenţierea celulelor progenitoare endoteliale. Inhibitorii deacetilării (VPA, TSA, BuA) menţin cromatina într-o stare acetilată, corespunzătoare unei forme decondensate. Nivelul histon-deacetilazelor a fost semnificativ scăzut în prezenţa acestor inhibitori, iar nivelul histonei H3 acetilate a crescut, aceste modificări fiind corelate cu expresia markerilor implicaţi în diferenţierea celulelor progenitoare endoteliale. Datele de biologie moleculară şi imunofenotipare au arătat că inhibitorii HDAC scad expresia pentru VWF, VEGFR2, eNOS, CD117, CD133, CD144, CXCR4 şi Tie-2, în timp ce expresia CD34 şi CD45 rămâne neschimbată demonstrând că histon-deacetilazele sunt implicate în diferenţierea endotelială. Expresia VE-caderin a fost inhibată semnificativ atât la nivelul ARNm cât şi la nivel proteic. Mecanismul care stă la baza modificării expresiei VE-caderin poate fi explicat prin imposibilitatea factorilor de transcripţie de tipul HoxC6, să interacţioneze cu histonele acetilate pentru a activa promotorul VE-caderin. Expresia genică a CXCR4, Tie-2 şi VEGFR2 a scăzut semnificativ în urma tratamentului cu TSA, mecanismul implicat fiind controlat de factorii de transcripţie Hox a căror expresie este modulată în prezenţa acestor inhibitori. Rezultatele noastre au arătat că, în

stare acetilată, expresia HoxD9 este crescută în celulele progenitoare endoteliale atât la nivel genic cât și proteic.

Procesul de neovascularizație este un poces complex care implică o serie de etape interconectate ducand la formarea de noi vase de sânge atunci când au loc leziuni vasculare în organismele adulte. Spre deosebire de angiogeneză, care reprezintă formarea de vase de sânge din unele pre-existente, neovascularizația are loc prin intermediul celulelor progenitoare endoteliale. Acestea sunt mobilizate să migreze, prolifereze și diferențieze la locul țintă, sub acțiunea citochinelor și a micromediului. Rezultale noastre au arătat că acetilarea inhibă procesul de neovascularizație *in vitro*, acționând la nivelul proceselor de proliferare, aderare, migrare și diferențiere a celulelor progenitoare endoteliale. Celulele progenitoare endoteliale au prezentat un nivel semnificativ scăzut al activității telomerazei în comparație cu controlul, sugerând o scădere a proliferării celulare.

Motilitatea celulară, evaluată folosind metoda " *wound-healing assay*" și prin măsurarea impedanței celulare, a demonstrat faptul că inhibitorii HDAC folosiți scad motilitatea celulară la 24 de ore de la stimulare. În schimb, chemotaxia celulelor progenitoare endoteliale a crescut în urma tratamentului cu inhibitori HDAC, fapt ce poate fi explicat prin menținerea fenotipului circulant al acestor celule progenitoare. În prezența VPA 3mM s-a observat o stimulare semnificativă a chemotaxiei celulelor progenitoare endoteliale către angiopoietina, VEGF și SDF. După proliferarea, mobilizarea, migrarea și aderarea celulelor endoteliale către situsul țintă, ultima etapă constă în organizarea lor în rețele vasculare. Am urmărit și această etapă în condiții de acetilare. Cultivarea pe Matrigel, în prezența de inhibitori HDAC a celulele progenitoare endoteliale, a arătat că acestea nu pot forma rețele vasculare. Pentru a confirma aceste rezultate am folosit și alte matrice pe bază de colagen. Rezultatele au arătat că celulele progenitoare endoteliale izolate din sângele de cordon ombilical au avut capacitatea de a supraviețui și adera la aceste matrice de colagen. Mai mult, aceste celule emit prelungiri, interacționează între ele și cu matricea, formând rețele în aceste structuri. În stare acetilată, celulele progenitoare endoteliale își pierd această capacitate, fapt ce demonstrează că acetilarea inhibă neovascularizația celulelor endoteliale *in vitro*.

Manipularea activității histon-deacetilazelor ar putea deveni un instrument util pentru a genera populații de celulele specifice în scopuri de transplant. Descoperirea modelelor de acetilare („*acetylation signature"*) implicate în diferențierea celulelor stem către diferitele tipurile celulare, deschide noi oportunități la interfața dintre chimie și biologia celulei stem, și poate oferi informații valoroase pentru a imbunătăți aplicațiile celulelor stem în ingineria tisulara și medicina regenerativă.

Număr de figuri în prima parte –32

Număr de figuri în partea originală (Partea a II-a) – 40

Indicații bibliografice – 251

Lucrări publicate în reviste internaționale cotate ISI – 4

Lucrări publicate în reviste naționale recunoscute CNCSIS B+ 1

Comunicări orale: 2

Rezumate ale lucrărilor prezentate la manifestări științifice internaționale – 11

Rezumate ale lucrărilor prezentate la manifestări științifice naționale - 25

Participarea la proiecte de cercetare – 2 naționale, 1 internațional.

Reducerea disfuncţiei renale prin modularea farmacologică a mecanismelor epigenetice implicate în acetilarea histonelor în diabetul experimental

Diabetul este o maladie care afectează ~9,3% din populaţia adultă la nivel mondial. Această boală metabolică complexă reprezintă un factor de risc major pentru dezvoltarea anumitor afecţiuni micro- si macrovasculare care scad calitatea vieţii şi cresc riscul evenimentelor cardiovasculare majore. Conform statisticilor, aproximativ 48% din totalul pacientilor diabetici au vârsta mai mică de 70 de ani. Diabetul este clasificat în diabet de tip 1 sau insulino-dependent caracterizat prin producţia insuficientă de insulina, care poate apărea încă din copilărie si diabet de tip 2, sau non-insulino dependent datorat modului ineficient al celulor de a utiliza insulina, acesta reprezintă 95% din cazurile de diabet globale şi apare, în general, la adulţi. Diabetul gestational, poate aparea în timpul sarcinii şi este caracterizat prin valori hiperglicemice, peste normal dar sub valorile patologiei diagnosticabile. Una dintre complicaţiile cronice ale diabetului este **nefropatia diabetica**, care se caracterizează prin alterarea funcţiei renale, conducând, în fazele avansate ale bolii la dializă sau transplant renal. Pacienţii cu nefropatie diabetică au un risc crescut de a dezvolta boli cardiovasculare şi un risc major de deces. [1]

Principalele caracteristici ale **nefropatiei diabetice** sunt micro-/macro-albuminuria, proteinuria, îngroşarea membranei bazale glomerulare, hipertrofia podocitelor, hiperplazia şi hipertrofia celulelor mezangiale, infiltrarea celulelor sistemului imunitar şi creşterea nivelului de specii reactive de oxigen. Răspunsul inflamator este menţinut la un nivel crescut prin activarea unor factori de transcriere pro-inflamatori, cum ar fi factorul nuclear kappa β (NF-kB), factorul de transcripţie AP-1, C/EBP, şi STAT1 care determină creşterea stresului oxidativ [2].

Modificările epigenetice determină creşterea expresiei de molecule care au un rol important în patofiziologia complicaţiilor vasculare asociate diabetului zaharat, cum ar fi complexul NADPH oxidaza, mediatori pro-inflamatori (citokine, chemokine) şi pro-fibrotici (elemente

de matrice extracelulara, factori de creştere), agenţi vasoactivi (endotelina-1), metaloproteinaza matriceală 9, moleculele de adeziune celulară vasculară (VCAM-1), molecule intracelulare de adeziune-1 (ICAM-1), E-selectina (E-sel). Aşadar, este foarte important să fie investigate noi mecanisme moleculare pentru a avea la dispoziţie alte abordari terapeutice în tratarea nefropatiei diabetice.

În această lucrare au fost investigate rolurile mecanismelor epigenetice implicate în acetilarea histonelor nucleozomale în instalarea stresului oxidativ, a inflamaţiei şi a fibrozei renale în diabetul experimental în vederea dezvoltării de noi terapii pentru tratamentul bolii renale diabetice.

Ipoteza acestei lucrări constă în faptul că hiperglicemia induce dezechilibrul mecanismelor epigenetice dependente de acetilarea histonelor, o condiţie patologică care determină o creştere a nivelurilor de exprimare specifice unor sisteme enzimatice implicate în producţia de specii reactive de oxigen şi a unor mediatori pro-inflamatori şi pro-fibrotici la nivel renal.

Obiectivele acestei teze au fost:

Obiectivul 1. Investigarea rolului căilor de semnalizare dependente de histon acetiltransferaza p300/CBP în instalarea stresului oxidativ, inflamaţiei şi fibrozei renale în diabetul experimental.

Obiectiv 2. Dezvoltarea unei strategii farmacologice inovatoare bazată pe triterpene pentru reducerea disfuncţiei renale în diabetul experimental.

Obiectivul 3. Dezvoltarea unei metode de detecţie a speciilor reactive de oxigen în ateroscleroza experimentală prin imagistică moleculară de înaltă rezoluţie în domeniul spectral infraroşu apropiat utilizând lipozomi funcţionalizaţi

Prima parte a tezei, intitulată stadiul actual al cunoaşterii bolilor rinichiului diabetic, oferă informaţii cu privire la mecanismele patologice care stau la baza instalării bolii renale diabetice sau nefropatiei diabetice.

În capitolul II, sunt prezentate contribuţiile ştiinţifice originale care vizează implicarea histon-acetiltransferazei p300/CBP în patologia nefropatiei diabetice punându-se un

accent deosebit pe sistemul enzimatic ce produce NADPH oxidaze (surse vasculare generatoare de specii reactive de oxigen şi stres oxidativ) şi pe moleculele pro-inflamatoarii şi pro-fibrotice. De asemenea au fost investigate potenţialele efecte terapeutice ale acidului ursolic şi a unui complex bioactiv standardizat format din Acid ursolic (90.7%) şi Acid oleanolic (5.8%) în modularea unor procese patofiziologice asociate disfuncţiei renale în diabetul experimental. Producţia crescută de specii reactive de oxigen şi creşterea stresului oxidativ reprezintă o caracteristică a bolilor cardiovasculare. În acest context, au fost realizate studii care stau la baza dezvoltării unei metode inovatoare pentru derminarea producţiei de specii reactive de oxigen *in vivo* pe modele animale cu ateroscleroză utilizând lipozomi functionalizaţi pentru încapsularea unui compus redox sensibil, ROS Brite™ 700, care prin oxidarea sa emite un semnal fluorescent specific în domeniul spectral infraroşu apropiat.

Concluzii

- **I.Analiza rolului căilor de semnalizare dependente de histon acetiltransferaza p300/CBP în instalarea stresului oxidativ, a inflamaţiei şi a fibrozei renale a şoarecilor diabetici în diabetul experimental.**

  În concluzie, în rinichii diabetici, activarea histon acetiltransferazei p300 / CBP duce la creşterea producţiei de ROS (cel mai probabil generate de proteinele Nox), a inflamaţiei şi a producţiei de proteine ale matricei extracelulare. Pe baza faptului că p300 / CBP este un important activator co-transcripţional care reglează expresia unei game largi de gene pro-oxidante, pro-inflamatorii şi pro-fibrotice, putem afirma că modularea farmacologică a p300 / CBP ar putea deveni o tentantă opţiune terapeutică în nefropatia diabetică.

- **II.Conceperea unei strategii farmacologice inovatoare bazată pe triterpene pentru reducerea disfunctiei renale in diabetul experimental.**

  Probele de extract de *Salvia officinalis* obţinute au un conţinut ridicat de acizi triterpenici, majoritar acid ursolic.

  La concentraţii de 1-10 μM, acizii triterpenici, anume ursolic, oleanolic, betulinic şi complexul bioactiv standardizat format din acizii triterpenici AU

(90.7%) şi AO (5.8%) determină reducerea nivelelor de exprimare ARNm specifice unor molecule pro-oxidante şi pro-inflamatorii cu rol important în patofiziologia complicațiilor cardiovasculare asociate diabetului zaharat.

Tratamentul şoarecilor diabetici cu acid ursolic sau complexul bioactiv standardizat format din AU (90.7%) şi AO (5.8%) a determinat scăderi semnificative ale hipertrofiei glomerulare şi a nivelelor de exprimare genică sau proteică specifice unor molecule (de stres oxidativ, inflamaţie şi fibroză) cu rol important în patofiziologia nefropatiei diabetice.

Acidul ursolic (UA) determină reducerea nivelelor de exprimare genică specifice unor molecule asociate fenotipului pro-inflamator (M1) al macrofagelor în cultură.

- **III.Detectarea speciilor reactive de oxigen vasculare produse *in vivo* în ateroscleroza experimentală prin imagistică cu spectrul de emisie în domeniul infraroşu apropiat de înaltă rezoluţie utilizând lipozomi funcţionalizaţi.**

  Datele obţinute indică faptul că încapsularea RB700 în Lp stabilizaţi steric ce ţintesc endoteliul ar putea deveni o metodă fiabilă pentru a cuantifica şi vizualiza direct locurile de formare a ROS în sistemul vascular şi organe la modelele animale . Această metodă ar putea fi aplicată nu numai în ateroscleroza experimentală, ci şi pentru cancer, diabet, obezitate şi boli neurodegenerative, deoarece toate aceste boli sunt caracterizate de formarea crescută a ROS. Mai mult, această nouă configuraţie pentru detectarea moleculară a ROS bazată pe RB700-Lp ce vizează endoteliul activat este de o importanţă deosebită pentru a sublinia intensitatea şi mecanismul (mecanismele) de producere a stresului oxidativ indus de factorii de risc asociat cu diferite patologii, precum şi ceea ce priveşte dezvoltarea şi testarea preclinică a noi medicamente şi strategii terapeutice.

Rezultatele originale obținute în cadrul acestei teze demonstrează că:

1. Activarea căilor de semnalizare legate de histon acetiltransferaza p300/CBP mediază hipertrofia glomerulară şi acumularea proteinelor matricei extracelulare în rinichii şoarecilor diabetici.
2. Inhibarea farmacologică a histonei acetiltransferazei p300/CBP reduce nivelul de acetilare al histonei 3 la restul de lizină 27 (H3K27ac) în rinichii şoarecilor diabetici comparativ cu animalele diabetice.
3. Histon acetiltransferaza p300/CBP mediază creşterea nivelurilor de exprimare genică şi proteică specifice subunităţilor Nox1, Nox2 şi Nox4 în rinichii şoarecilor diabetici.
4. Inhibarea farmacologică a histon acetiltransferazei p300/CBP reduce formarea de specii reactive de oxigen în rinichii şoarecilor diabetici.
5. Tratamentul şoarecilor diabetici cu C646, un inhibitor specific al p300/CBP, reduce semnificativ nivelurile proteice specifice subtipurilor Nox1 şi Nox4 la nivel glomerular.
6. Inhibarea farmacologică a coactivatorului p300/CBP reduce semnificativ activitatea factorilor de transcriere NF-kB şi STAT.
7. Activarea histon acetiltransferazei p300/CBP mediază creşterea nivelurilor genice ale unor mediatori pro-inflamatori (MCP-1, TNFα, NOS2, ICAM-1, VCAM-1, E-selectină) şi pro-fibrotici (colagen IV, fibronectina, laminina).
8. Tratamentul şoarecilor diabetici cu acid ursolic sau cu complexul bioactiv standardizat format din acid ursolic (90.7%) şi acid oleanolic (5.8%) determină scăderi semnificative ale hipertrofiei glomerulare şi a nivelurilor de exprimare genică/proteică specifice unor molecule asociate stresului oxidativ, inflamaţiei şi fibrozei cu rol important în patofiziologia nefropatiei diabetice.
9. Acidul ursolic reduce nivelurile genice specifice subunităţilor catalitice Nox1, Nox2, Nox4 şi Nox5 şi a mediatorilor pro-inflamatori MCP-1, TNFα şi NOS2 în Mac cu fenotip pro-inflamator (M1-Mac) şi a moleculelor de adeziune ICAM-1, VCAM-1 şi E-selectina.
10. Tratamentul şoarecilor diabetici cu acid ursolic sau cu complexul bioactiv standardizat obţinut din frunze de *Salvia officinalis* ce conţine acid ursolic (90.7%) şi acid oleanolic (5.8%) determină o scădere semnificativă a expresiei

proteice a Nox1, Nox2 si Nox4, şi a producţiei de specii reactive de oxigen la nivel glomerular, precum şi formării produşilor precum 4-HNE şi a expresiei de VCAM-1 la nivel glomerular în rinichii şoarecilor diabetici.

11. Lipozomii stabilizaţi steric şi direcţionaţi către molecula de adeziune pro-inflamatoare VCAM-1 reprezintă un sistem de transport eficient de concentrare a indicatorului redox RB700 la nivelul leziunilor aterosclerotice la şoareci ApoE-/-.

Bibliografie

[1]. Saeedi Pouya, Inga Petersohn, Paraskevi Salpea, Belma Malanda, Suvi Karuranga, Nigel Unwin, Stephen Colagiuri, et al. "Global and Regional Diabetes Prevalence Estimates for 2019 and Projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th Edition." Diabetes Research and Clinical Practice 157 (2019): 107843. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843.

[2]. Vlad Mihaela-Loredana, Simona-Adriana Manea, Alexandra-Gela Lazar, Monica Raicu, Horia Muresian, Maya Simionescu, and Adrian Manea. "Histone Acetyltransferase-Dependent Pathways Mediate Upregulation of NADPH Oxidase 5 in Human Macrophages under Inflammatory Conditions: A Potential Mechanism of Reactive Oxygen Species Overproduction in Atherosclerosis." Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2019 (2019): 3201062. https://doi.org/10.1155/2019/3201062.

ACADEMIA ROMANA

Institutul de Biologie si Patologie Celulara

“Nicolae Simionescu”, Bucuresti

TEZA DE DOCTORAT

Studii privind diferentierea celulelor progenitoare in cadiomiocite in scopul eficientizarii transplantului celular cardiac

Conducator Stiintific
Acad. Maya Simionescu

Doctorand
Ana-Maria Rosca

2012

CUPRINS

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOSTINTELOR

I.1. Efectul ischemiei asupra celulelor musculare cardiace

I.1.1. Organizarea structurala a cardiomiocitului

I.1.2 Metabolismul celulei musculare cardiace

I.1.3. Ischemia miocardului

I.1.4. Procesul patologic al cardiomiopatiei ischemice

I.1.5 Apoptoza celulelor musculare cardiace

I.1.5.1. Calea extrinseca de initiere a apoptozei in cardiomiocite

I.1.5.2. Calea intrinseca de initiere a apoptozai in cardiomiocite

I.1.5.3. Rolul proteinelor din familia Bcl-2 in reglarea apoptozei cardiomiocitelor

I.2. Celule stem mezenchimale din maduva osoasa hematogena

I.2.1. Structura maduvei osoase

I.2.2 Celulele stem mezenchimale

I.2.2.1. Potentialul osteogenic

I.2.2.2. Potentialul adipogenic

I.2.2.3. Potentialul condrogenic

I.2.2.4. Nisa celulelor stem mezenchimale

I.2.2.4.1. Componentele celulare

I.2.2.4.2. Componentele solubile

I.2.2.4.3. Componentele matricei extracelulare

I.2.2.5. Rolul celulelor stem mezenchimale in sustinerea celulelor stem hematopoietice

I.2.2.6. Migrarea celulelor stem mezenchimale si repararea tisulara

I.3. Mecanisme prin care celulele stem mezenchimale contribuie la repararea cardiaca

I.3.1. Diferentierea celulelor stem mezenchimale dupa transplantare in miocardul infarctizat

I.3.2. Actiunea paracrina a factorilor eliberati de celulele stem mezenchimale in miocardul infarctizat

I.4. Terapia cu celule stem pentru repararea cardiaca

I.4.1. Celulele stem mezenchimale

I.4.2. Mioblastii scheletici

I.4.3. Celulele progenitoare din maduva osoasa

I.4.4. Celulele stem embrionare

I.4.5. Celulele pluripotente induse (iPS)

I.4.6. Celulele stem cardiace

I.4.7. Studii clinice

II CONTRIBUTII ORIGINALE

II.1.Alterari moleculare care induc apoptoza cardiomiocitelor in ischemie-reperfuzie

II.1.1. Introducere si obiective

II.1.2. Materiale si metode

II.1.3.Rezultate

II.1.3.1. Caracterizarea cardiomiocitelor neonatale

II.1.3.2. Apoptoza cardiomiocitelor in ischemie

II.1.3.3. Modificarile moleculare ale proteinelor Bcl-2 induse de ischemie-reperfuzie
II.1.3.4. Efectul oxidantilor exogeni asupra apoptozei cardiomiocitelor
II.1.3.5. Modificarile proteinelor Bcl-2 induse de oxidantii exogeni in CMC
II.1.4. Discutii si concluzii
II.2. Metode alternative de izolare a celulelor stem mezenchimale
II.2.1. Purificarea celulelor stem (in gradient de Percoll)
II.2.1.1.Introducere si obiective
II.2.1.1. Materiale si metode
II.2.1.3. Rezultate
II.2.1.3.1. Localizarea si cuantificarea celulelor c-kit si Sca-1 pozitive in maduva osoasa de soarece
II.2.1.3.2. Separarea celulelor din maduva osoasa pe gradient de Percoll
II.2.1.3.3. Cuantificarea celulelor progenitoare in fractiile obtinute in urma centrifugarii aspiratului medular pe gradient discontinuu de Percoll
II.2.1.3.4. Evaluarea potentialului clonogen al celulelor progenitoare hematopoietice
II.2.1.3.5. Expresia markerilor de celule diferentiate in fractii
II.2.1.4. Discutii/concluzii
II.2.2. Izolarea celulelor stem mezenchimale din maduva osoasa hematogena
II.2.2.1. Introducere si obiective
II.2.2.2. Materiale si metode
II.2.2.3. Rezultate si discutii
II.2.2.3.1. Caracterizarea fenotipica a celulelor
II.2.2.3.2. Caracterizarea functionala a celulelor stem mezenchimale
II.2.2.4. Concluzii
II.3. Diferentierea celulelor stem mezenchimale in cardiomiocite
II.3.1. Diferentierea in vitro a celulelor stem mezenchimale in cardiomiocite
II.3.1.1. Introducere si obiective
II.3.1.2. Materiale si Metode
II.3.1.3. Rezultate
II.3.1.3.1. Caracterizarea celulelor stem
II.3.1.3.2. Multipotenta celulelor stem mezenchimale dupa tratamentul cu 5-azacitidina
II.3.1.3.3. Capacitatea 5-azacitidinei de a induce diferentierea miogena in celulele stem mezenchimale
II.3.1.4. Concluzii
II.3.2. Influenta factorilor secretati de miocard asupra diferentierii celulelor stem mezenchimale in cardiomiocite
II.3.2.1. Introducere si obiective
II.3.2.2. Materiale si metode
II.3.2.3. Rezultate
II.3.2.3.1. Testarea capacitatii de diferentiere a celulelor stromale medulare

II.3.2.3.2. Tehnici de marcare celulara
II.3.2.3.3. Diferentierea celulelor stromale medulare indusa de cocultura cu celule musculare cardiace
II.3.2.3.4. Diferentierea celulelor stromale medulare indusa de cocultura cu miocard fetal
II.3.2.4. Concluzii
II.4. Evidentierea factorilor cu efect paracrin secretati de celulele stem mezenchimale in conditii normale si hipoxice
II.4.1. Introducere si obiective
II.4.2. Materiale si metode
II.4.2. Rezultate si discutii
II.4.2.1. Conditii de inducere a apoptozei in celulele musculare cardiace
II.4.2.2. Rezistenta MSC la apoptoza indusa de ischemie
II.4.2.3. Efectul anti-apoptotic al factorilor eliberati de celulele stem mezenchimale asupra crdiomiocitelor
II.4.2.4. Identificarea factorilor cu efect cardioprotector eliberati de MSC normale si hipoxice
II.4.4. Concluzii

III. Rezumatul tezei si concluzii generale
IV. Bibliografie
Lucrari publicate in cadrul tezei de doctorat
Finantarea cercetarilor

CUVINTE CHEIE

Cardiomiocite

Apoptoza

Ischemie/Reperfuzie

Oxidanti exogeni

Celule stem mezenchimale

Diferentiere adipogena

Diferentiere osteogena

Diferentiere condrogena

Diferentiere miogena

Hipoxie

Gradient de Percoll

Efect cardioprotector

Mediu conditionat

microRNA

REZUMAT

Introducere – stadiul actual al cunoştinţelor

Miopatiile ischemice şi non-ischemice duc la disfuncţia ventriculului stâng şi în final la insuficienţă cardiacă. Aceasta din urmă scade calitatea vieţii, speranţa de viaţă şi creşte costurile medicale, constituind astfel una din problemele majore de sănătate (McMurray şi Pfeffer, 2005). Terapiile actuale asigură într-o oarecare măsură supravieţuirea şi îmbunătăţirea simptomelor, dar nu poate reversa condiţia ţesutului cardiac de la o stare bolnavă la una sănătoasă (Kuraitis *et al.*, 2011). Dezvoltarea recentă a domeniului celulelor stem ar putea oferi o cale de trata insuficienţa cardiacă prin înlocuirea ţesutului lezat cu ţesut sănătos, fapt ce ar duce la sporirea calităţii vieţii şi supravieţuirea pacienţilor cu diverse cardiomiopatii.

Celulele stem mezenchimale (MSC) din măduva osoasă au fost intens studiate pentru proprietăţile lor regenerative şi imunomodulatoare. Studiile pe modele animale au arătat că tratamentul cu MSC îmbunătăţeşte funcţia cardiacă în urma infarctului miocardic prin scăderea apoptozei şi producerea de factori angiogeni (Tang *et al.*, 2005). Deoarece capacitatea de diferenţiere a MSC în CMC este foarte scăzută şi nu poate explica efectul benefic tranzitoriu al transplantului acestora la locul infarctului observat în studiile preclinice sau clinice (Rose *et al.*, 2008), acest efect a fost pus pe seama efectului paracrin al acestor celule (Gnecchi *et al.*, 2008). Acestea sunt capabile să elibereze factori solubili (citokine, chemokine, factori de creştere) care să acţioneze într-o manieră paracrină asupra celulelor miocardului lezat. Mai mult decât atât, recent a fost demonstrat că MSC sunt capabile să comunice cu celulele învecinate prin intermediul unor fragmente membranare circulare, numite microvezicule. Astfel, MSC pot secreta diverse componente solubile, precum receptori, factori de creştere, lipide biologic active, dar şi acizi nucleici (ARN mesager şi microARN) protejate de acţiunea agresivă a mediului extracelulular (Morel *et al.*, 2004; Gatti *et al.*, 2011).

MSC prezintă o serie de avantaje pentru utilizarea lor în medicină regenerativă, precum: (i) aceste celule pot fi izolate cu uşurinţă şi propagate în cultură pentru a obţine un număr mare de celule, adecvat pentru terapia celulară, (ii) au imunogenicitate scăzută, ceea ce le face potrivite şi pentru transplantul alogen (Dai *et al.*, 2005) şi datorită acestui fapt sunt evitate problemele de etică adiacente altor tipuri de celule stem utilizate pentru transplant, precum celulele stem embrionare (iii).

În acest context, scopul acestei teze a fost studierea unor aspecte privind atât apoptoza CMC în condiții ischemice, precum şi diferențierea MSC obținute din măduva osoasă adultă de şoarece către celule musculare cardiace. Astfel, pe parcursul intregii perioade de doctorat, studiile realizate au fost focalizate pe înțelegerea mecanismelor prin care miocardul este lezat in timpul si consecutiv infarctului miocardic si pe gasirea unei metode eficiente de reparare a acestui tesut. Teza de față este structurata în două părți principale: prima parte prezintă stadiul actual al cunoştințelor legate de subiectul lucrării de doctorat, prezentat pe parcursul a patru capitole, iar cea de-a doua parte prezintă contribuțiile originale ale doctorandului la cunoaşterea ştiințifică, organizate de asemenea în patru capitole.

I. **Alterări moleculare care duc la apoptoza cardiomiocitelor în ischemie-reperfuzie**

Capitolul I a căutat să răspundă la întrebarea dacă ischemia sau reperfuzia este responsabilă de inducerea apoptozei în CMC. Cunoaşterea principalului stimul răspunzător de inducerea a procesului apoptotic în CMC este necesar pentru găsirea unei terapii de încetinire a progresiei insuficientei cardiace datorate pierderii miocardului contractil. Scopul acestui prim studiu a fost determinarea contribuției individuale a ischemiei, reperfuziei şi oxidanților exogeni la inducerea apoptozei în CMC, stabilind astfel contribuția majoră la progresia insuficientei cardiace în ischemia/reperfuzia miocardului.

Astfel, prima parte contribuțiilor originale s-a focalizat pe identificarea principalului stimul răspunzător de inițierea apoptozei în miocard, informație extrem de importantă pentru dezvoltarea unei terapii pentru progresia insuficienței cardiace datorate pierderii miocardului contractil. Rezultatele obținute în această primă etapă a stagiului de doctorat au arătat că principalul inductor al apoptozei în ischemie/reperfuzie a fost reperfuzia, mai degrabă decât ischemia *per se*. Studiul respectiv a demonstrat că oxidanții exogeni aduşi din mediul înconjurător în timpul reperfuziei sunt principalii determinanți ai apoptozei CMC. 25-hidroxicolesterolul, un component al LDL oxidat, promovează apoptoza CMC printr-un mecanism dependent de caspaza-3, care presupune creşterea expresiei proteinei pro-apoptotice Bax (figura 1), reglată la nivel transcripțional, concomitent cu degradarea post-translaționala a proteinei-anti-apoptotice Bcl-2 (figura 2). Alterarea raportului proteinelor pro- şi anti-apoptotice creează condiții favorabile inițierii procesului apoptotic, care se poate desfăşura doar în timpul reperfuziei, când rezervele de ATP şi glucoză sunt refăcute. Datele obținute în urma acestui studiu indică faptul că terapia cu antioxidanți, ar putea juca un rol important pentru salvarea

miocardului viabil în urma unui infarct prin prevenirea pierderii CMC prin moarte celulară programată.

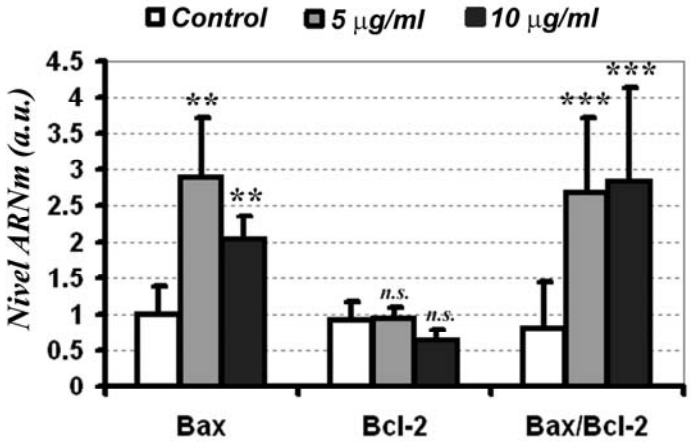


Figura 1: Modificări induse de tratamentul cu 25-HC în expresia genică a proteinelor pro- şi anti-apoptotice Bax şi Bcl-2 în CMC după 72 de ore de tratament cu 25-HC.

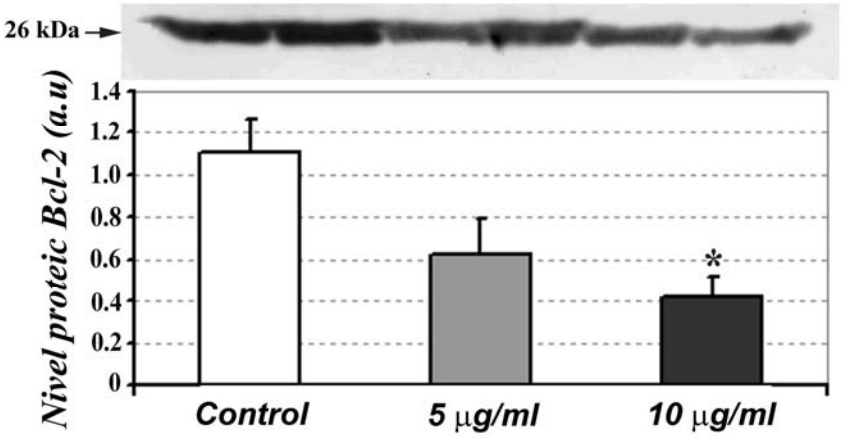


Figura 2: Cuantificarea prin Western Blot a nivelului expresiei proteice a Bcl-2 după tratamentul CMC cu 25-HC.

II. Izolarea celulelor stem mezenchimale

Următoarea etapă a stagiului a presupus punerea la punct a unor metode de obținere a MSC din măduva osoasă de şoarece adult, în vederea utilizării acestora în studii de diferențiere în CMC. Această etapă a studiilor de doctorat a prezentat un interes special deoarece, aşa cum este cunoscut în literatură, MSC de şoarece sunt mult mai dificil de izolat şi de propagat *in vitro* decât celulele umane sau de şobolan, din cauza contaminării cu celule de origine hematopoietică. Din

această cauză, obținerea unei culturi de MSC de şoarece a reprezentat o provocare care s-a concretizat în izolarea acestui tip de celule concomitent prin două metode. Cultura pură de MSC obținută a fost ulterior caracterizată conform sugestiilor Societății Internaționale de Transplant Celular.

II.1. **Izolarea celulelor stem pe gradient de Percoll**

Rezultatele obținute au arătat că centrifugarea aspiratului medular de şoarece pe un gradient discontinuu de Percoll determină separarea celulelor în şase fracții, corespunzător densităților 1.050, 1.057, 1.067, 1.070, 1.076 şi 1.083 g/ml (figura 3). Celulele progenitoare, caracterizate de expresia markerilor Sca-1 şi c-kit, s-au regăsit în fracțiile III-V.

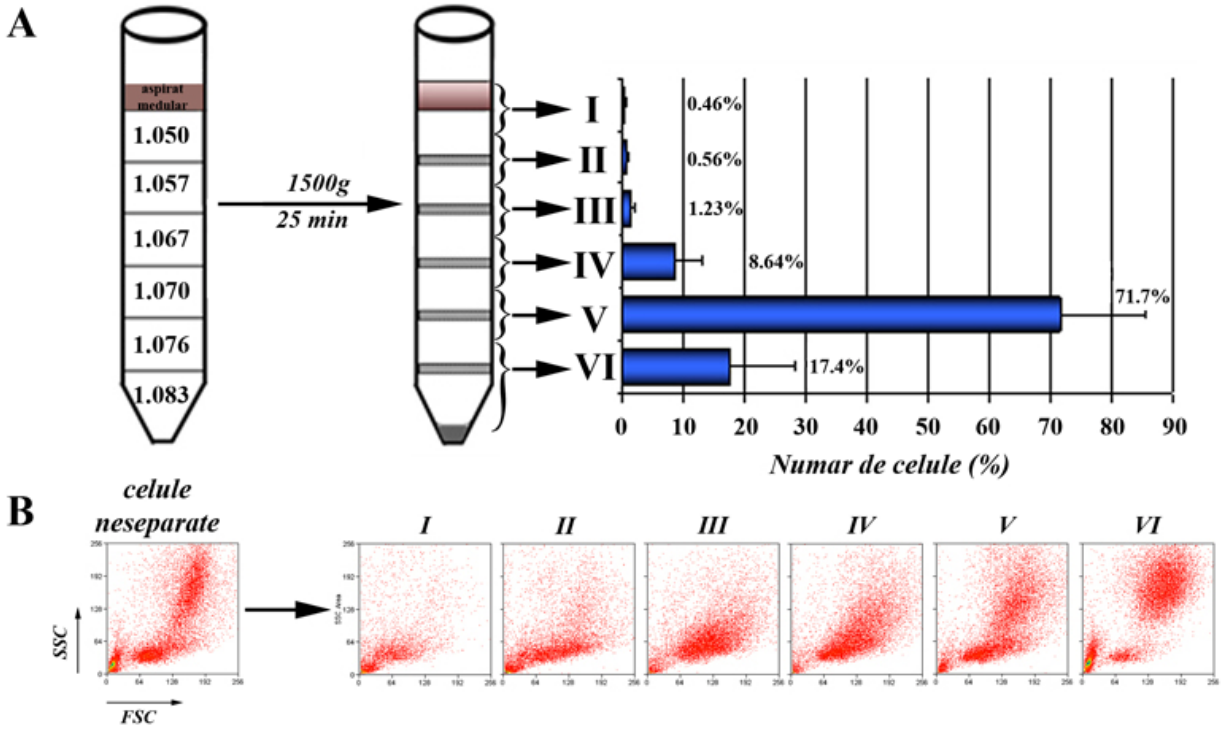


Figura 3: Separarea celulelor din măduva osoasă în şase fracții prin centrifugare pe gradient discontinuu de Percoll. (A) Ilustrare schematică a gradientului de Percoll discontinuu folosit pentru fracționare şi procentele corespunzătoare celulelor recuperate din fiecare fracție după centrifugare. (B) Histograme de citometrie de flux ilustrând heterogenitatea celulelor înainte de separare şi morfologia celulelor în fiecare fracție.

Fracția IV a fost considerată ca fiind de interes, deoarece la nivelul acesteia au segregat aproximativ $2x10^6$ celule progenitoare dintr-un total de $4.3x10^6$ celule (figura 4). Deşi compoziția

celulară a acestei fracții a fost heterogenă, aceasta a cuprins, pe lângă celule c-kit şi Sca-1 pozitive, şi celule endoteliale, care ar putea juca un rol important în refacerea miocardului lezat după infarct, prin contribuția la revascularizarea țesutului prin angiogeneză. Prin cultivare, aceasta fracție a generat o cultură $CD45^{-}$/$c\text{-}kit^{-}$/$Sca\text{-}1^{+}$/$PECAM^{-}$/$VEGFR2^{-}$/osteocalcină$^{-}$/colagen II^{-}, care, prin incubare în condiții specifice de diferențiere, a generat adipocite şi osteoblaste, demonstrând caracterul multipotent al acestor celule (figurile 5 si 6).

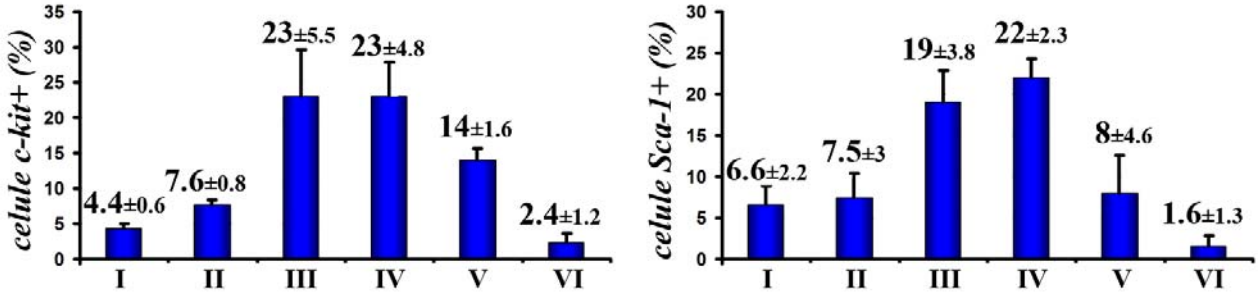


Figura 4: Reprezentarea grafică a mediei procentelor de celule c-kit^{+}, respectiv Sca-1^{+} din fiecare fracție din trei experimente diferite.

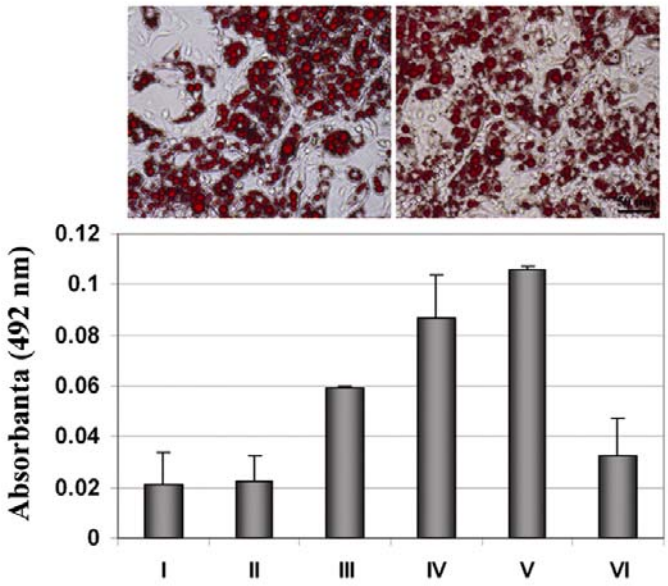


Figura 5: Cuantificarea spectrofotometrică a acumulării de lipide în cele şase fracții după cultivarea celulelor în mediu adipogenic. În partea superioară se găsesc imagini reprezentative ale fracțiilor III şi IV colorate cu Oil Red. Fracția V, deşi prezintă acumulare masivă de lipide, nu este îmbogățită în celule progenitoare, colorația datorându-se probabil prezenței preadipocitelor la acest nivel.

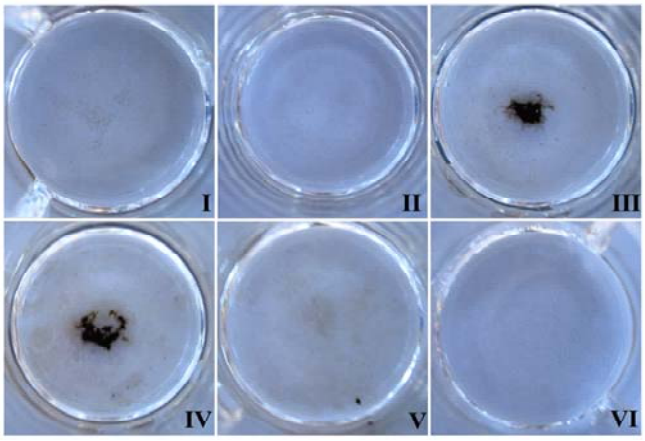


Figura 6: Imagine de microscopie optică reprezentând coloraţia von Kossa a celulelor aderente obţinute din cele şase fracţii după două săptămâni de cultivare în mediu osteogenic. Se observă că fracţiile III şi IV, dar nu şi fracţia V (care conţine majoritatea celulelor) au fost capabile să genereze osteoblaste în condiţii de cultură specifice.

II.2. **Izolarea celulelor stem mezenchimale din maduva osoasa hematogena**

In paralel cu metoda prezentata anterior, a fost obtinuta o populatie de celule stem mezenchimale prin mentinerea in cultura aspiratului medular pentru o perioada mai lunga, de aproximativ opt saptamani. Celulele obtinute au format o cultura omogena, cu aspect fibroblast-like si potențial mare de proliferare, fiind uşor de expandat *in vitro*. Caracterizarea acestei culturi prin RT-PCR (figura 7a) a arătat expresia markerilor de celule stem Sca-1 şi CD105 (endoglina), dar şi lipsa markerului c-kit, ceea ce a indicat sărăcirea în celule progenitoare hematopoietice. O altă caracteristică a acestor celule a constituit-o prezența filamentelor intermediare de vimentină si nestină. Expresia acestor proteine (figura 7b) a sugerat un posibil rol în procesul de regenerare tisulară deoarece prezența filamentelor de nestină este specifică celulelor tinere, cu capacitate de migrare.

Caracterizarea acestor celule a fost completată cu studii de diferențiere către multiple tipuri celulare, precum adipocite, osteoblaste, condrocite şi a demonstrat caracterul multipotent al acestora, menținut nealterat pe parcursul mai multor pasaje (figura 8). Această cultură a fost utilizată în studiile ulterioare de diferențiere către un fenotip muscular, ale caror rezultate sunt cuprinse in Capitolul III al tezei.

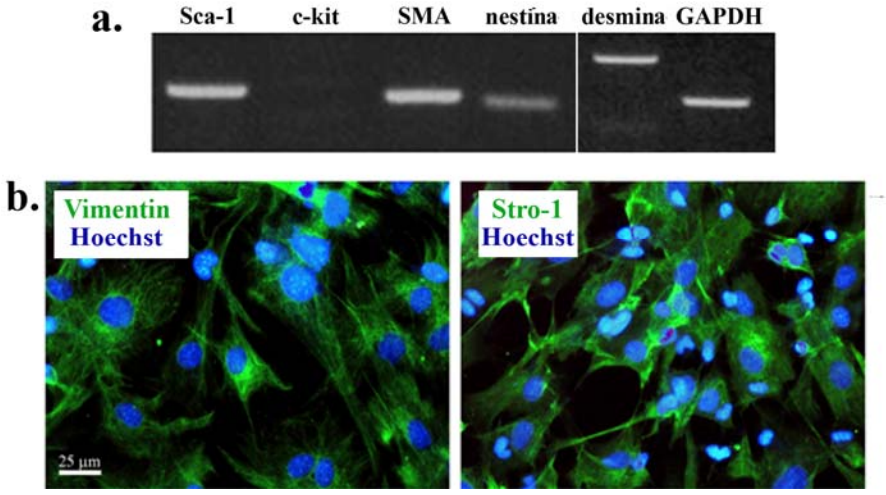


Figura 7: ***(a)*** *RT-PCR arătând expresia la nivel de ARNm a markerilor de MSC: Sca-1, actina specifică celulelor musculare netede (SMA) şi desmina şi lipsa expresiei markerului de celule stem hematopoietice c-kit;* ***(b)*** *Imagine de imunocitochimie arătând prezenta filamentelor intermediare de vimentină şi a markerului de celule stromale Stro-1 la nivelul tuturor celulelor din cultură.*

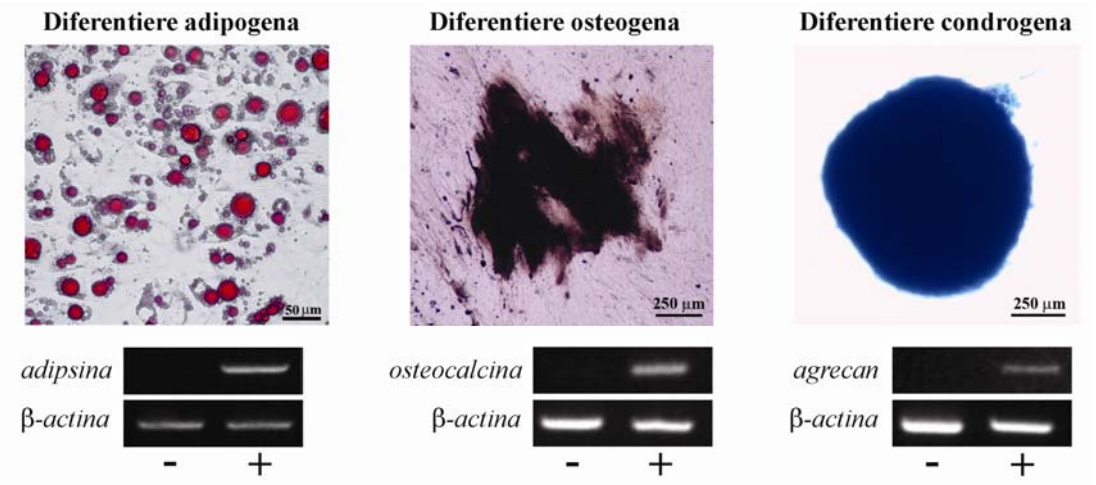


Figura 8: Caracterizarea proprietății de multipotență a MSC. În partea stângă a imaginii este evidențiată diferențierea celulelor către adipocite prin colorarea acumulărilor intracitoplasmatice de lipide cu Oil Red O şi prin determinarea expresiei genice de adipsină prin RT-PCR. În partea centrală se observă diferențierea celulelor către osteoblaste. Sus este prezentat un nodul de calcefiere colorat prin tehnica von Kossa, iar jos este prezentată inducerea expresiei de osteocalcină (RT-PCR). În partea dreaptă este evidențiată sinteza de mucopolizaharide acide a celulelor diferențiate în condrocite prin colorație cu Alcian Blue, precum şi expresia proteoglicanului agrecan în celulele diferențiate.

III. Studii de diferențiere a celulelor stem mezenchimale în cardiomiocite

Pentru inducerea diferențierii MSC către un fenotip cardiac a fost utilizată 5-azacitidina, un compus cu acțiune de demetilare a materialului genetic, cunoscut pentru capacitatea sa de a potența diferențierea celulelor stem embrionare către CMC.

Un punct de interes l-a constituit de asemenea acțiunea 5-azacitidinei asupra multipotenței celulelor stem, respectiv a capacității acestui compus de a afecta capacitatea MSC de a se diferenția către multiple linii celulare. Rezultatele au arătat că celulele tratate cu 5-azacitidina şi-au pierdut progresiv capacitatea de a se diferenția către adipocite şi osteoblaste când au fost incubate în condiții de diferențiere specifice. Un rezultat neaşteptat l-a constituit creşterea potențialului de diferențiere condrogenică consecutiv tratamentului cu 5-azacitidina. Concluzia acestui studiu a fost că MSC îşi păstrează proprietatea de multipotență după prima expunere la acțiunea 5-azacitidinei, dar aceasta este redusă progresiv cu fiecare expunere, concomitent cu creşterea capacității celulelor tratate de a genera condrocite (figura 9).

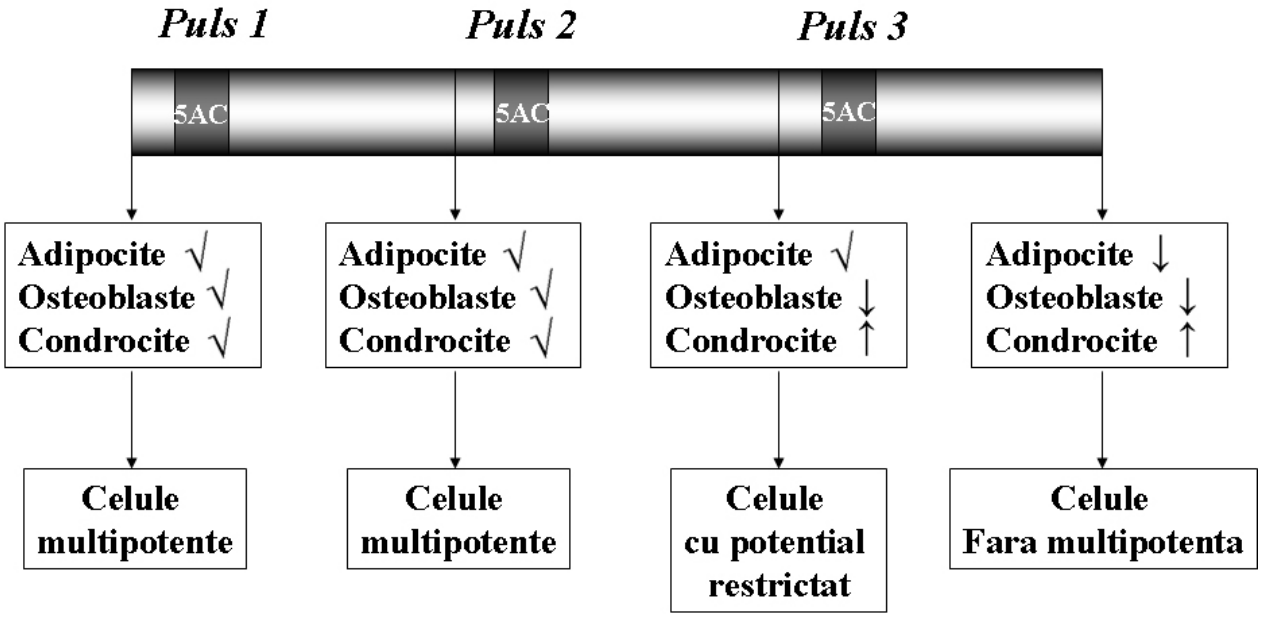


Figura 9: Efectul tratamentului cu 5-azacitidina asupra multipotenței MSC. Aceasta proprietate a devenit restrictată după mai mult de o expunere la 5-azacitidină. După 2 sau 3 pulsuri cu 5-azacitidină, capacitatea MSC de a se diferenția către condrocite a crescut considerabil.

În paralel cu punerea în evidență a modificării caracterului pluripotent al MSC prin tratamentul cu 5-azacitidina, a fost urmărită capacitatea acestui agent demetilant de a induce

diferențierea acestor celule către un fenotip muscular cardiac. Dupa cum se observa in figurile 10 si 11, cu exceptia unor gene specific musculare (α-actina cardiacă, canalul de calciu de tip L), nu a fost indusă expresia nici uneia dintre genele implicate în diferențierea musculaturii cardiace în celulele tratate. Cu toate acestea, 5-azacitidina a indus expresia unor gene specifice musculaturii striate, ceea ce permis diferențierea MSC în mioblaşti în condiții miogene specifice (figura 12). În concluzie, tratamentul MSC cu 5-azacitidină ar putea favoriza diferențierea acestora în celule cardiace, cu condiția determinării unor factori specifici care ar putea influența finalizarea procesului de diferențiere către CMC mature şi funcționale.

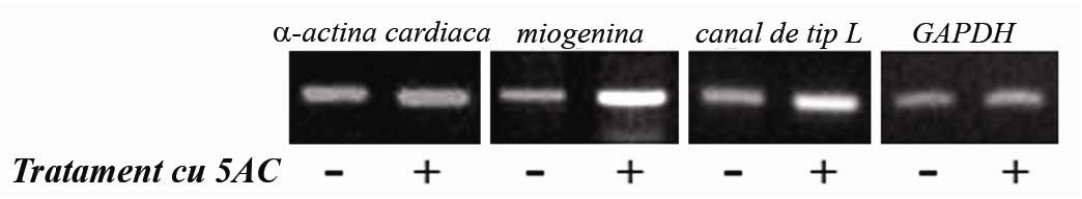


Figura 10: Imagine de RT-PCR arătând expresia crescută a unor gene specific musculare după tratamentul cu 5-azacitidină.

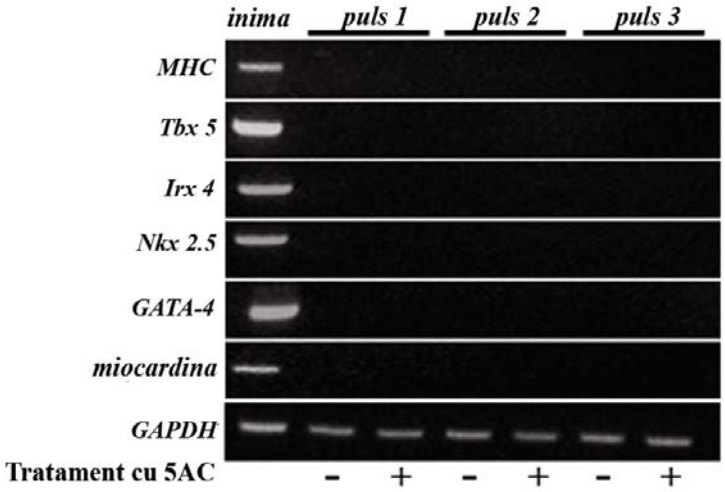


Figura 11: Imagine de RT PCR în care se observă absența inducerii expresiei factorilor de transcripție, precum şi a altor gene specific cardiace după tratamentul cu 5-azacitidină.

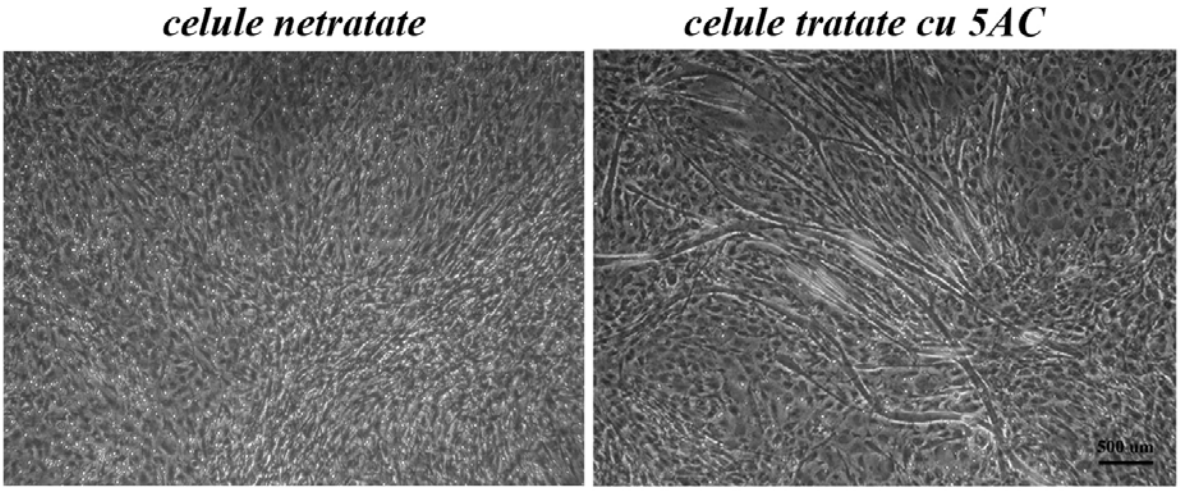
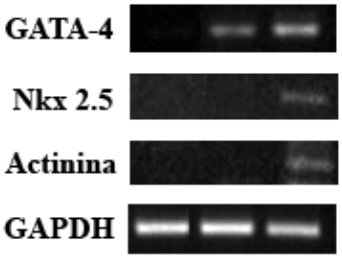


Figura 12: Imagine de microscopie in contrast de faza aratand prezenta miotubilor formati in cultura de celule stem mezenchimale tratate cu 5-azacitidina dupa deprivarea de ser.

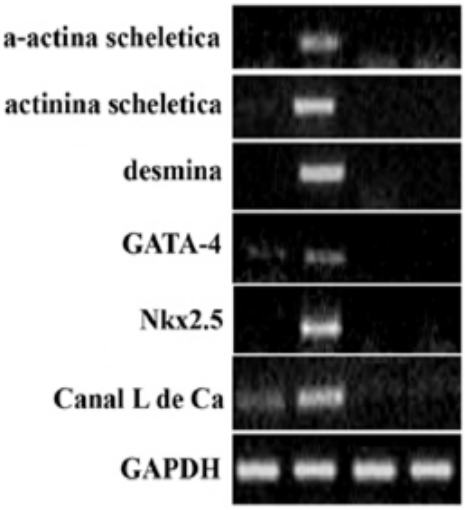
Ca urmare a acestor observații, am considerat că tratamentul cu 5-azacitidină asociat cu contactul direct cu celulele musculare cardiace ar putea avea un efect benefic asupra diferențierii celulelor stromale în CMC. Astfel, în continuare am urmărit modificările apărute în celulele stromale medulare prin contact direct cu celule musculare cardiace. Rezultatele au arată că, într-adevăr, cumularea celor doi factori inductori, a dus la inițierea expresiei unor factori de transcripție specific cardiaci în celule stromale medulare de şoarece, precum GATA-4 şi Nkx2.5 (figura 13). Mai mult, s-a observat că expresia acestuia din urmă a fost indusă doar în cazul cumulării celor două condiții de diferențiere. În plus, în acest caz, a fost evidențiată şi expresia actiniei, un indicator al diferențierii către un fenotip muscular de tip striat.

Mai mult decât atât, rezultatele experimentelor de cocultură în camere duble au arătat ca factorii solubili eliberați de miocardul ischemic împreună cu tratamentul cu 5-azacitidină au avut ca efect creşterea diferențierii celulelor medulare către un fenotip cardiac. Astfel, cumularea expunerii la acțiunea 5-azacitidinei cu semnalele provenite de la țesutul miocardic ischemic au avut ca rezultat inițierea transcrierii unor factori esențiali implicați în procesul de diferențiere cardiomiogenă, cum cum sunt: actina şi actinina caracteristice musculaturii de tip striat, desmina, GATA-4 şi Nkx2.5 şi a canalului de calciu de tip L (figura 14). Astfel, se poate concluziona că inițierea diferențierii indusă de demetilarea anumitor gene este ajutată de efectul unor factori cardiaci solubili, care au capacitatea să finalizeze acest proces.



CSA	+	+	+
CMC	-	+	+
5AC	-	-	+

Figura 13: RT-PCR arătând inducerea expresiei genice a unor markeri cardiaci în cazul celulelor tratate cu 5-azacitidină după 1 săptămâna de la inițierea coculturii cu CMC fetale. Se observă că efectul cumulat al celor 2 condiții (tratamentul cu 5-azacitidină şi contactul direct dintre celulele stromale şi CMC) este superior contactului simplu dintre cele două tipuri celulare.



Inima	+	+	-	-
CSA	+	+	+	+
5AC	-	+	-	+

Figura 14: RT-PCR arătând inducerea expresiei genice a markerilor de celule musculare cardiace în prezența cumulării celor doi factori de inducere a diferențierii celulelor stromale medulare adulte în CMC: 5-azacitidina şi factorii locali eliberați de miocardul ischemic.

IV. Evidențierea factorilor cu efec paracrin secretați de celulele stem mezenchimale în condiții normale şi hipoxice

Ultimul capitol al tezei a fost realizat că urmare a informațiilor recente apărute în literatura de specialitate privind rezultatele studiilor clinice. Acestea au arătat faptul că efectele benefice ale transplantului de celule stem în infarctul miocardic sunt tranziente, ceea ce sugerează un efect paracrin exercitat de celulele transplantate, prin intermediul secreției de factori cardioprotectori şi angiogeni. În aceste condiții, ultima parte a tezei a cuprins studiul efectului anti-apoptotic al factorilor solubili eliberați de MSC asupra celulelor musculare cardiace şi identificarea unor factori cu acțiune cardioprotectoare eliberați de MSC în condiții normale şi hipoxice. O observație de o importanță deosebită făcută în urma acestor experimente a fost capacitatea MSC de a se adapta şi de a rezista la condiții hipoxice, fapt demonstrat de rezistența acestor celule la apoptoza indusă de condițiile hipoxice (figura 15).

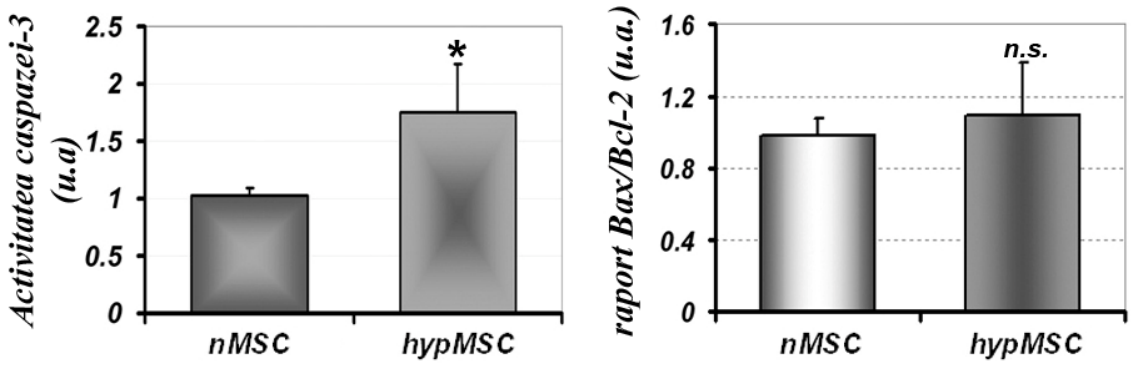


Figura 15: Rezistența MSC în condiții ischemice: graficul din stânga arata o uşoară creştere a activității caspazei-3, în timp de raportul dintre expresia genică a proteinei pro-apoptotice Bax şi proteinei anti-apoptotice Bcl-2, determinat prin PCR cantitativ, rămâne neschimbat (graficul din partea dreaptă).

Rezistența MSC la apotoza indusă de hipoxie are o importanță deosebită pentru supraviețuirea acestora în miocardul infarctizat, în situația în care acesta este lipsit de o vascularizație corespunzătoare asigurării necesarului de oxigen.

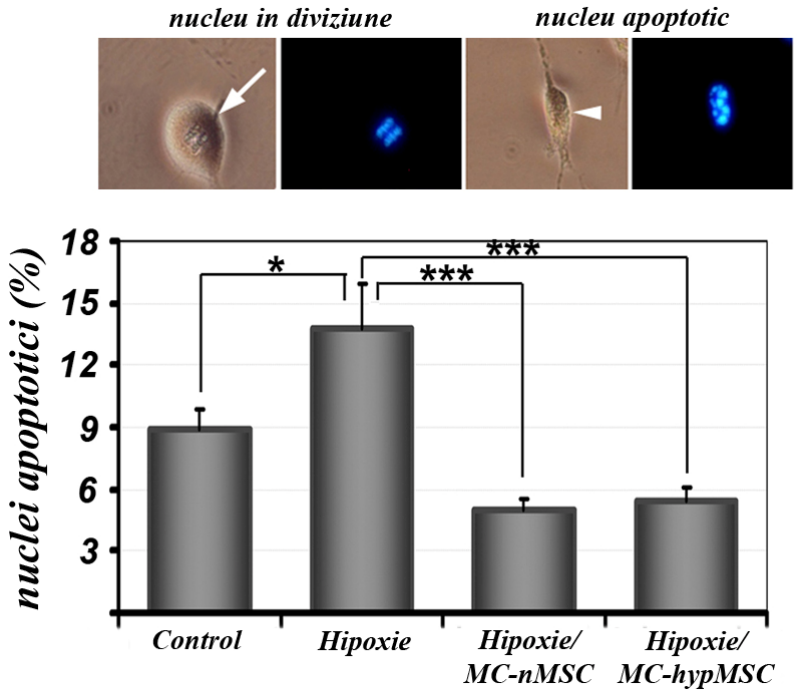


Figura 16: Determinarea cantitativă a apoptozei în miocitele cardiace după expunerea la hipoxie în prezența şi absența mediului condiționat recoltat de la MSC. În graficul din partea de jos sunt prezentate procentele de nuclei apoptotici determinați prin colorație cu Hoechst. Pentru fiecare test au fost numărați cel puțin 1000 de nuclei (, p< 0.05; ***, p< 0.001). În partea de sus sunt prezentate imagini cu nuclei în diviziune comparativ cu nuclei apoptotici.*

Investigarea efectului mediului condiționat al MSC asupra apoptozei CMC indusă de hipoxie a arătat că MSC secretă factori cu acțiune cardioprotectoare. Incubarea CMC în mediu condiționat a prevenit inducerea apoptozei (figura 16). Rezultatele au demonstrat menținerea integrității membranei mitocondriale, fapt ce a contribuit la prevenirea inițierii procesului apoptotic. Mai mult decât atât, mediul condiționat recoltat de pe MSC hipoxice a avut efecte similare cu cel recoltat de pe celule cultivate în 20% O_2, ceea ce demonstrează faptul că MSC îşi păstrează proprietățile cardioprotectoare în condiții hipoxice. Acest rezultat sugerează posibilitatea ca MSC transplantate în miocard hipoxic să contribuie la supraviețuirea CMC afectate atât de hipoxie, cât şi de stressul oxidativ din timpul reperfuziei.

Studiul compozitiei mediului conditionat al MSC a aratat ca aceste celule sunt capabile să îşi păstreze capacitatea de a sintetiza şi a elibera în mediul extracelular unii factori cu efect cardioprotector, cum ar fi unele citokine sau microARN. Au fost identificate astfel o serie de citokine secretate de către MSC incubate în conditi normale, dintre care patru au fost regăsite în

mediul MSC incubate în hipoxie în cantități similare cu controlul: TIMP-1, MCP-1, IL1ra şi SDF-1α (figura 17).

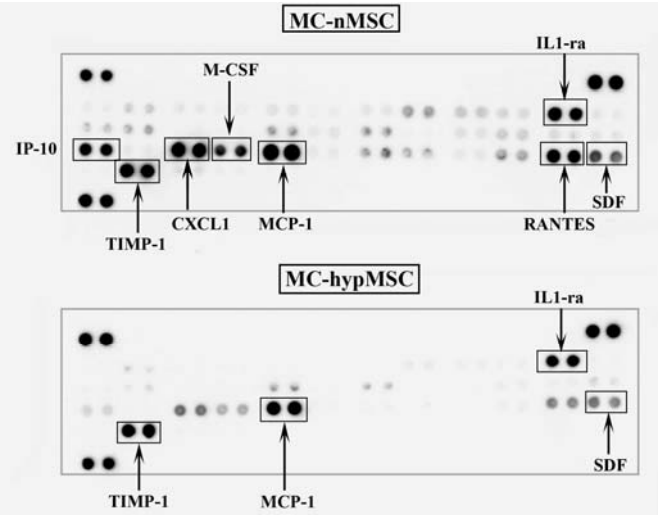


Figura 17: Identificarea citokinelor secretate în mediul condiţionat de către MSC normoxice (partea de sus a imaginii) şi hipoxice (partea de jos) prin tehnica "cytokine array".

Conform datelor din literatură, aceşti factori ar putea fi responsabili, cel puțin în parte, de efectul cardioprotector exercitat de prezența MSC la nivelul miocardului ischemic, fie datorită acțiunii antiapoptotice, fie capacității de a induce procesul de angiogeneză, important pentru restabilirea aprovizionării țesutului cu oxigen şi nutrienți. Pe lângă aceste molecule, se pare că transferul de informație genetică între MSC şi celulele lezate este un mecanism important responsabil de efectul reparator al MSC. Astfel, în mediul extracelular al MSC hipoxice a fost observată o creştere a cantității de microARN 199a şi 1225b, cunoscute pentru efectul anti-apoptotic (figurile 18 si 19).

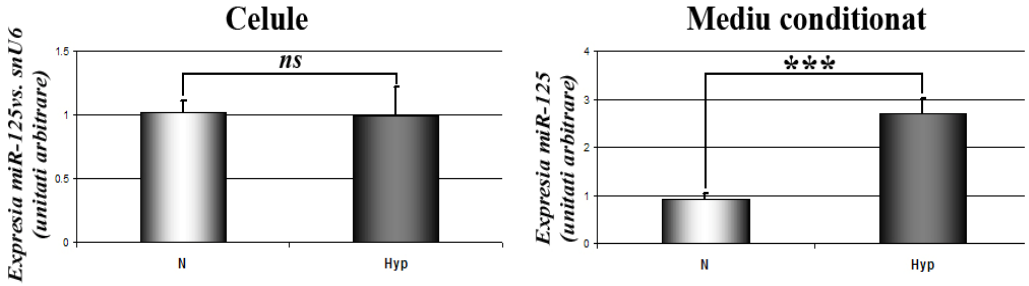


Figura 18: Cuantificarea prin PCR cantitativ a expresiei microRNA-125 în MSC incubate în condiții normoxic şi hipoxice (graficul din stânga), precum şi în mediul extracelular recoltat de pe celulele menținute în cele două condiții (** p<0.0005).*

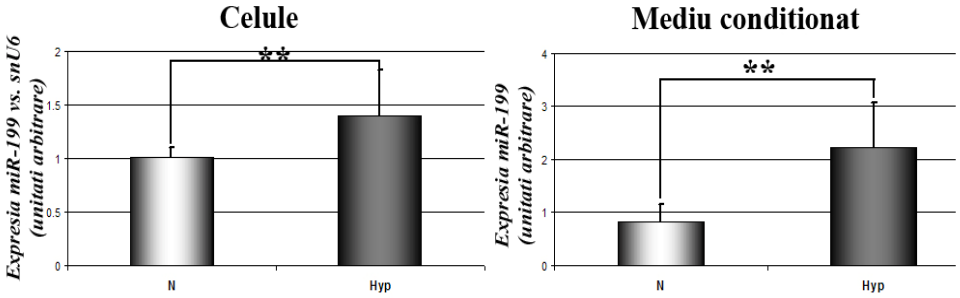


*Figura 19: Cuantificarea prin PCR cantitativ a expresiei microRNA-199 în MSC incubate în condiţii normoxic şi hipoxice (graficul din stânga), precum şi în mediul extracelular recoltat de pe celulele menţinute în cele două condiţii (** p<0.005).*

În concluzie, compoziția mediului extracelular al MSC consta într-un amestec de factori cu efect fie anti-apoptotic (TIMP-1, MCP-1, miR-199a, miR-125b), fie de inhibare a proliferării fibroblastilor (IL1ra) sau angiogenic (SDF-1α). Prezența acestor factori cardioprotectori în secreția MSC ar putea fi responsabilă de efectul anti-apoptotic asupra CMC hipoxice observat în condițiile noastre experimentale.

Concluzii

Informațiile cuprinse in lucrarea de doctorat reprezintă rezultate, concretizate în articole publicate în reviste internaționale cu factor de impact ISI, prezentări orale sau sub formă de poster la manifestări ştiinţifice naţionale şi internaţionale. Pe parcursul perioadei de doctorat, în urma experimentelor realizate, au fost obținute următoarele rezultate importante:

- S-a demonstrat că principalul factor inductor al apoptozei CMC în urma ischemiei miocardului este reprezentat de oxidanții exogeni aduşi de reperfuzie;
- S-a pus la punct o metodă de obținere a unei populații de celule progenitoare obținute prin fracționarea aspiratului medular prin centrifugare pe gradient discontinuu de Percoll;
- S-au obținut culturi omogene de MSC, care au îndeplinit standardele de caracterizare indicate de Societatea Internațională de Transplant Celular;
- A fost arătat efectul acțiunii demetilante a 5-azacitidinei asupra caracterului pluripotent al MSC;
- A fost demonstrat efectul îmbunătățit al cumulării acțiunii 5-azacitidinei cu factorii eliberați de miocard pentru creşterea diferențierii MSC către un fenotip cardiac;

- A fost demonstrat efectul anti-apoptotic al factorilor eliberați de MSC normale şi hipoxice asupra CMC;
- Au fost identificați factori cu acțiune anti-apoptotică, anti-fibrotică şi pro-angiogenă în mediul extracelular al MSC normale şi hipoxice, posibil responsabili de acțiunea cardioprotectoare a acestor celule.

Bibliografie

1. McMurray JJ. and Pfeffer MA. Heart failure. Lancet 2005; 365: 1877-89.
2. Kuraitis D, Ruel M, Suuronen EJ. Mesenchymal stem cells for cardiovascular regeneration. Cardiovasc Drugs Ther. 2011;25(4):349-62.
3. Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. J Am Coll Cardiol. 2005 Oct 4;46(7):1339-50.
4. Rose RA, Jiang H, Wang X, Helke S, Tsoporis JN, Gong N, Keating SC, Parker TG, Backx PH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro. Stem Cells. 2008;26:2884–92.
5. Gnecchi M, Zhang Z, Ni A and Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. Circ. Res. 2008; 103: 1204-19.
6. Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. Nephrol Dial Transplant. 2011 May;26(5):1474-83.
7. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. Curr. Opin. Hematol. 2004;11(3):156-64.
8. Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. Circulation 2005; 112: 214-23.

ACADEMIA ROMANA
INSTITUTUL DE BIOLOGIE SI PATOLOGIE CELULARA
„NICOLAE SIMIONESCU”

MODULAREA EXPRESIEI SI FUNCTIEI UNOR MARKERI INFLAMATORI ASOCIATI PATOLOGIEI CARDIOVASCULARE

REZUMAT

Conducator stiintific:

Acad. MAYA SIMIONESCU

Doctorand:

GAN ANA-MARIA

BUCURESTI
2012

CUPRINS

Cuvant inainte

Introducere

Partea I

STADIUL ACTUAL AL CUNOSTINTELOR PRIVIND PROCESUL INFLAMATOR ASOCIAT PATOLOGIEI CARDIOVASCULARE

I. Caracteristici ale procesului inflamator asociat patologiei cardiovasculare

I. 1. Mecanisme inflamatorii in aterogeneza

I. 2. Rolul efectorilor imunitatii inascute si a sistemului imun adaptativ in procesul inflamator asociat aterosclerozei

I. 3. Receptori/mediatori ai procesului inflamator

I.3. 1. Pentraxinele imunomodulator in aterogeneza

I.3. 2. Toll-like receptor (TLR) implicati in inflamatia vasculara

I.3. 3. Receptorii citoplasmatici NOD (nucleotide-binding domain-like); asocierea sistemului inflamazom in sinteza de citokine inflamatorii

II. Rolul citokinelor in modularea inflamatiei vasculare; mecanisme de semnalizare induse de citokinele pro-inflamatoare

II. 1. TNF-α modulator al inflamatiei in celulele peretelui vascular

II. 2. Interleukinele familiei IL-1 exacerbeaza inflamatia vasculara

II. 3. Interleukina-6 (IL-6) factor de risc in boala cardiovasculara

II. 4. Rolul semnalizarii trans in inflamatia cardiovasculara

II. 5. Rezistina – rol in inflamatia asociata bolilor cardiovasculare

II. 6. STAT - mediator al semnalizarii induse de cross-talkul dintre IFN-γ si TLR in boala cardiovasculara

II. 7. Reglatorii semnalizarii induse de citokine

III. Chemokinele - mediatori ai interactiei celule vasculare-leucocite; markeri in boala cardiovasculara

III. 1. Inflamatia vasculara modulata prin axa chemokina/receptor *MCP-1* (CCL2)/ *CCR2*

III. 2. Axa CX3CL1/CX3CR1 - implicatie in “cross-talk-ul” dintre celulele vasculare-leucocite

IV. Diabetul – factor de risc cardiovascular

IV. 1. Mecanisme pro-aterogene asociate hiperglicemiei

Partea II CONTRIBUTII ORIGINALE

- **Obiective**

I. Glucoza crescuta induce expresia fractalkinei si „monocyte chemotactic protein-1” (MCP-1) in celulele musculare netede

I.1. Expresia chemokinelor MCP-1 si fractalkina in celulele musculare netede (CMN) umane activate de glucoza crescuta si rolul functional al acestora

a. Intoducere si obiective
b. Materiale si metode
c. Rezultate
d. Discutii si concluzii

I.2. Caile de semnalizare prin care glucoza crescuta induce expresia chemokinelor MCP-1 si fractalkina in celulele musculare netede

a. Intoducere si obiective
b. Materiale si metode
c. Rezultate
d. Discutii si concluzii

II. Axa *CX3CL1/CX3CR1* este implicata in dialogul dintre celulele musculare netede si monocite; exacerbarea expresiei de molecule pro-inflamatoare

II.1. Interactia dintre celule musculare netede umane si monocite implicata in amplificarea raspunsului inflamator

a. Intoducere si obiective
b. Materiale si metode
c. Rezultate
d. Discutii si concluzii

II.2. Cai de semnalizare implicate in interactia CMN-monocit dependenta de axa *CX3CL1/CX3CR1*

a. Intoducere si obiective
b. Materiale si metode
c. Rezultate
d. Discutii si concluzii

III. Efectul inflamator al rezistinei in celulele musculare netede; modularea expresiei de fractalkina/CX3CR1 prin implicarea TLR4 si calea de semnalizare dependenta de proteinele Gi

III.1. Rezistina moduleaza expresia CX3CL1/CX3CR1 in celulele musculare netede dependent de factorii de transcriptie NF-kB, AP-1 si STAT

a. Intoducere si obiective
b. Materiale si metode
c. Rezultate
d. Discutii si concluzii

III.2. Modularea expresiei unor supresori ai semnalizarii citokinice (SOCS) induse de rezistina in celulele musculare netede

a. Intoducere si obiective
b. Materiale si metode
c. Rezultate
d. Discutii si concluzii

IV. Investigarea mecanismelor moleculare implicate in reglarea expresiei fractalkinei asociata proceselor aterogene

IV.1. Analiza *in silco* si clonarea promotorului genic al fractalkinei; factori de transcriptie implicati in reglarea promotorului genic de fractalkina

a. Intoducere si obiective
b. Materiale si metode
c. Rezultate
d. Discutii si concluzii

Concluzii generale
Rezumat teza
Bibliografie
Lista lucrarilor publicate
Lista lucrarilor prezentate la manifestari stiintifice
Granturi

Cuvinte cheie: boli cardiovasculare, atersoscleroza, inflamatie, markeri ai inflamatiei, citokine, chemokine, diabet, rezistina, fractalkina, MCP-1, celule musculare netede vasculare umane, monocite, comunicare inter-celulara, MAPK-kinaze, factori de transcriptie inflamatori, promotor.

Bolile cardiovasculare alaturi de aliatul principal, disfunctia metabolica, reprezinta principala problema socio-medicala din tarile dezvoltate. Numarul pacientilor cu boli cardiovasculare este in continua crestere, ceea ce impune imbunatatirea algoritmului de prognostic prezent prin identificarea unor factori de risc moleculari strans corelati cu statusul bolii si elucidarea mecanismelor celulare si moleculare asociate acestora, precum si identificarea unor noi strategii terapeutice. Factorii de risc traditionali implicati in dezvoltarea patologiilor cardiovasculare sunt diabetul, hiperlipidemia, obezitatea, hipertensiunea iar de curand, procesele inflamatorii au fost si ele asociate.

Procesul patologic fundamental si principala cauza a bolilor cardiovasculare este **ateroscleroza.** Ateroscleroza este boala multifactoriala a carei patogeneza nu este inca deplin inteleasa, insa inflamatia si procesele sale celulare complexe joacă un rol important in progresia leziunii. Ateroscleroza implica interactii complexe intre celulele inflamatorii (neutrofile, limfocite, monocite/macrofage) si celulele vasculare (celulele endoteliale, celulele musculare netede). Inflamatia este factor de risc independent pentru procesle aterosclerotice dar mecanismele implicate sunt inca necunoscute.

Mecanismele imuno-inflamatoare sunt direct implicate in initierea si progresia bolilor cardiovasculare (CV) de la stadiul incipient asimtomatic de *injurie vasculara*, la manifestarile clinice de *disfunctie si remodelare vasculara*. Deoarece injuria vasculara este in parte reversibila identificarea fenotipului inflamator este esentiala pentru suprimarea proceselor inflamatorii, precum si in dezoltarea noilor strategii terapeutice. Procesul inflamator din leziunea aterosclerotica implica participarea unor *efectori moleculari* (receptori “pattern recognition”, molecule inflamatorii bioactive) si a unor *efectori celulari* (monocite/macrofage, limfocite, celule prezentatoare de antigen si celule dentritice). Mai mult, mediatorii implicati in modularea proceselor inflamatoare pot fi ***markeri ai proceselor inflamatorii vasculare***, dar si potentiale tinte terapeutice. Prin tehnologiile avansate de proteomica, metabolomica si genetica s-au: i) identificat biomarkeri prezumtivi sau factori de risc; ii) dezvoltat tinte terapeutice, iii) imbogatit eficienta terapiile dezvoltate anterior; astfel ca, unii biomarkeri sunt etalon experimental, strans corelati cu statusul bolii. Evidentierea mecanismelor moleculare de semnalizare specifice implicate in expresia si actiunea acestor markeri in celulele peretelui vascular nu au fost inca elucidate.

In incercarea de a aduce noi date care sa contribuie la descifrarea mecanismelor inflamatorii asociate aterosclerozei, lucrarea de fata isi propune sa identifice mecanismele moleculare implicate in modularea raspunsului inflamator din celulele peretelui vascular. Identificarea mecanismelor moleculare inflamatorii este necesara pentru "screeningul" timpuriu al pacientilor cu boala cardiovasculara, in monitorizarea terapiei anti-inflamatoare prin cuantificarea biomarkerilor inflamatori dar si in dezvoltarea unor terapii tintite.

In prima parte a tezei „ Stadiul actual al cunostintelor", sunt prezentate pe parcursul a patru capitole diferite caracteristici ale procesului inflamator asociat patologiei cardiovasculare.

Capitolul I descrie mecanismele inflamatorii asociate aterogenezei precum si rolul efectorilor imunitatii inascute si a sistemului imun adaptativ in procesul inflamator. Mecanismele imunitatii inascute au rol central in initierea aterosclerozei prin activarea receptorilor "pattern-recognition" (PRR) care favorizeaza raspunsul inflamator. Ca raspuns al legarii si activarii PRR sunt eliberati *efectori ai imunitatii inascute* precum *peptide* (CRP, sistemul complement), *oxidul nitric* (NO), *eicosanoizii (*prostaglandine si leucotriene*)* si *molecule inflamatoare* (citokine,chemokine). De asemenea, studii multiple indica si rolul important al raspunsului ***antigen-specific*** in procesul aterosclerotic modulat prin efectori ai imunitatii adaptative. Astfel, sistemul imun adaptativ poate influenta procesele aterogene pe trei cai diferite: i) *interactii celula-celula* intre celula prezentatoare de antigen, macrofage, limf B sau CD si limf T; ii) *eliberare de citokine* prin limf T activate care mediaza activarea macrofagelor si a altor celule din placa; iii) *secretie anticorpi* prin limf B dependent /independent de limf T.

Capitolul al-II-lea prezinta rolul citokinelor in modularea inflamatiei vasculare si mecanismele de semnalizare induse de citokinele pro-inflamatoare. Nivelul crescut de citokine mentine statusul inflamator asociat disfunctiei vasculare in boli precum ateroscleroza, hipertensiune, aneurismul aortic abdominal si vene varicoase. Efectele biologice ale citokinelor pro-inflamatoare TNF-α, IL-1 si IL-6 se reflecta in mecanismele inflamatorii asociate aterosclerozei.

Capitolul al-III-lea descrie **chemokinele** ca mediatori in interactia celulelor vasculare-leucocite. Chemokinele sunt modulatori chemoatractanti pentru diferitele subpopulatii de leucocite dar si pentru celulele nonhematopoetice (CMN), ca raspuns la stimuli activatori. Chemokinele si receptorii specifici alcatuiesc un sistem chemokinic complex, care atrage subseturi leucocitare specifice in fiecare etapa a procesului aterogen. Recrutarea subseturilor leucocitare la situsul inflamator implica diverse chemokine, angajate in interactii heterofile favorizate de proteoglicani. Studii recente au aratat ca nivelul circulant al chemokinelor poate fi asociat diverselor boli inflamatorii precum iar ***MCP-1*** este factor de prognostic independent in sindromul coronar acut. Inflamatia vasculara poate fi modulata prin axa chemokina/receptor ***MCP-1***(CCL2)/***CCR2*** iar strategii precum terapia genica (*mutant de deletie a genei MCP-1*) sau tintirea farmacologica diminueaza raspunsul inflamator astfel, MCP-1 poate fi atat **marker de prognostic** cat si **tinta**

terapeutica. De asemenea ***axa CX3CL1/CX3CR1*** poate fi implicata in dialogul dintre celulele vasculare-leucocite, studii imunohistochimice au confirmat prezenta axei CX3L1/CX3CR1 la nivelul placii aterosclerotice coronare (monocite/macrofage, CE, CMN). Celulele musculare netede (CMN) din neointima placii aterosclerotice exprima CX3CR1 ceea ce demonstreaza ca, CMN migreaza din media datorita CX3CR1, dependent de gradientul de CX3CL1 din intima. Axa CX3L1/CX3CR1 mediaza ancorarea monocitelor/macrofage la CMN din placa ceea ce sustine capacitatea de tintire terapeutica a acestei cai pro-inflamatorii in boala cardiovasculara. In concluzie, *sistemul Fk/CX3CR1* poate fi considerat cea mai promitatoare tinta pro-inflamatoare pentru interventia terapeutica in procesul aterosclerotic iar mecanismele de semnalizare intracelulara trebuie pe deplin intelese pentru a dezvolta o noua clasa de agenti anti-inflamatori.

Capitolul al-IV-lea prezinta diabetul ca factor de risc cardiovascular major independent, asociat complicatiilor micro/macrovasculare prin accelerarea proceselor aterosclerotice. Atat diabetul cat si ateroscleroza sunt conditii multifactoriale care par sa aiba o baza inflamatoare comuna, deoarece in ambele patologii sunt eliberati *markeri inflamatori de faza acuta* (CRP, IL-6 acid sialic, amiloid A, cortizon) specifici imunitatii inascute. Mecanismele pro-aterogene asociate hiperglicemiei din celulele peretelui vascular sunt detaliate pe larg in acest capitol.

In incercarea de a descifra atat mecanismele celulare si moleculare ale inflamatiei asociata proceselor aterosclerotice, cat si a elabora o strategie terapeutica care sa diminueze acest process cu rol important in initierea ulterioara a bolii cardiovasculare, lucrarea de fata s-a concentrat in cadrul partii a II-a a tezei ”Contributii originale” pe urmatoarele obiective principale:

I. Rolul concentratiei crescute de glucoza in exacerbarea inflamatiei in celulele musculare netede; efectul fibratilor (activatori de PPARα) in modularea expresiei si functiei de chemokine (MCP-1 si fractalkina)

II. Evidentierea cailor de semnalizare celulare prin care glucoza regleaza expresia chemokinelor MCP-1 si fractalkina in celulele musculare netede

III. Studiul interactiei dintre celulele musculare netede si monocite in modularea expresiei moleculelor pro-aterogene; evidentierea rolului axei CX3CL1-CX3CR1 in medierea interactiei celulare

IV. Cai de semnalizare implicate in interactia CMN-monocit dependent de axa CX3CL1/CX3CR1

V. Rolul rezistinei in modularea fenotipului celulelor musculare netede; mecanisme moleculare implicate in actiunea rezistinei la nivelul celulelor musculare netede vasculare.

VI. Caracterizarea promotorului functional de fractalkina

In **capitolul I** am inclus studiile cu privire la efectele concentratiei crescute de glucoza in modularea expresiei de fractalkina si MCP-1 in celulele musculare netede si rolul functional al acestor chemokine, si anume, adeziunea si chemotaxia monocitelor la celule activate de glucoza

crescuta. In plus, am urmarit efectul activatorilor de PPARα (fenofibrat si clofibrat) asupra expresiei de fractalkina si MCP-1 in celulele musculare netede umane expuse la concentratie crescuta de glucoza dar si mecanismele de semnalizare implicate in actiunea glucozei crescute in aceste celule.

Rezultatele acestui studiu au aratat ca nivelelul crescut de glucoza induce expresia fractalkinei si a MCP-1 in celulele muscular netede umane direct proportional cu concentratia de glucoza. Rezultatele obtinute sustin studiile anterioare care au identificat prezenta fractalkinei in intima vaselor. Mai mult, activatorii PPARα, ***fenofibratul*** si ***clofibratul*** reduc expresia genica si proteica a MCP-1 si fractalkinei in CMN activate de glucoza crescuta. Efectul glucozei asupra chemokinelor MCP-1 si fractalkina se reflecta la nivel functional prin numarul crescut de monocite aderate la CMN. Procesul de adeziune al monocitelor la CMN activate de glucoza este dependent de aceste chemokine, intrucat inhibarea semnalizarii cu *toxina pertussis* reduce numarul monocitelor aderate in conditii de flux laminar continuu. In particular, rolul MCP-1 si fractlkinei este subliniat de experimentele in care receptorii specifici ai acestor chemokine au fost blocati (prin incubare cu anticorpi specifici), ceea ce condus la diminuarea numarului de monocite aderate.

Mecanismul de semnalizare implicat in supraexpresia MCP-1 si fractalkinei indusa de glucoza crescuta determina activarea protein kinazele ERK1/2 si p38MAPK si a factorilor de transcriere NF-kB si AP-1, dependent de speciile reactive de oxigen eliberate (ROS). Inhibarea speciilor reactive de oxigen cu *PDTC* si *DPI* reduce activarea ERK1/2 si p38 MAPK sugerand implicarea stresului oxidativ in activarea MAPK. De asemenea inhibarea kinazelor p38MAPK si a ERK1/2 cu inhibitori specifici (SB203580 sau PD98095), reduc complet fosforilarea ***IkBα*** si a ***c-jun*** sugerand rolul p38MAPK si p42/44MAPK in activarea NF-kB, respectiv AP-1. Mai mult, am studiat rolul NF-kB si AP-1 in expresia fractalkinei si MCP-1, prin transfectia CMN cu oligodeoxinucleotide de competitie pentru p65 si c-Jun. Blocarea situsurilor de legare NF-kB si AP-1 reduce expresia proteica a MCP-1 si fractalkinei, sugerand implicarea factorilor de transcriptie in modularea ambelor chemokine. Clofibratul si fenofibratul diminueaza fosforilarea/activarea kinazelor p38MAPK si ERK1/2, astfel ca este impiedicata translocarea factorilor de transcriptie NF-kB si AP-1 respectiv eliberarea de MCP-1 si fractalkina.

In concluzie, studiile din acest capitol demonstreaza ca activarea CMN vasculare prin supraexpresia acestor chemokine, induce cresterea interactiilor adezive dintre monocite si CMN, studiu ce poate explica unul din mecanismele aterosclerozei accelerate indusa in conditii diabetice.

In **capitolul II** am investigat rolul axei ***CX3CL1/CX3CR1*** in dialogul dintre celulele musculare netede si monocite dar si implicarea acestei cai in exacerbarea expresiei de molecule proinflamatoare, bazandu-ne pe studii anterioare care atesta prezenta fractalkinei si receptorul sau la nivelul placii aterosclerotice coronare. Astfel am presupus ca interactia dintre CMN si monocite se

poate realiza prin intermediul *fractalkina-CX3CR1* ceea ce poate influenta fiecare tip celular prin modularea moleculelor inflamatoare cu rol important in progresia placii aterosclerotice.

Rezultatele obtinute demonstreaza arata ca interactia dintre CMN si monocite sau CMN si monocite activate cu LPS (lipopolizaharide) creste expresia moleculelor TNFα, IL-1β, IL-6, CX3CR1 si MMP-2,-9 in ambele tipuri celulare iar activarea suplimentara a monocitelor cu LPS exacerbeaza expresia TNFα, CX3CR1 si MMP-9. Modularea expresiei TNFα, CX3CR1 si MMP-9 este dependenta de *axa fractalkina-CX3CR1* pe cand expresia IL-6, IL-1β si MMP-2 este independenta de legarea acestei perechi receptor-ligand. Interactia monocite-CMN activeaza kinaza p38MAPK care succesiv transduce factorii de transcriptie NF-kB si AP-1 care ulterior faciliteaza producerea moleculelor pro-aterogene (citokine si MMP). Comunicarea dintre CMN si monocite prin legarea fractalkinei la receporul sau este dependenta de transductia factorului de transcriptie ***AP-1*** implicat in reglarea expresiei moleculelor pro-aterogene TNFα, CX3CR1 si MMP9.

Datele in acest studiu extind rolul cunoscut al fractalkinei si receptorului acesteia si sugereaza ca in placa aterosclerotica, comunicarea directa intre celulele musculare netede si monocite amplifica raspunsul inflamator prin *axa fractalkina–CX3CR1* care functioneaza ca inducator al unor molecule critice pentru progresia ateromului. Astfel, perechea CX3CL1-CX3CR1 poate constitui o noua tinta terapeutica pentru a reduce procesul inflamator asociat aterosclerozei.

In **capitolul III** am urmarit efectul inflamator al rezistinei in celulele musculare netede prin modularea expresiei de fractalkina si CX3CR1 dependent de receptorul TLR4.

Scopul acestui studiu a fost de a investiga rolul rezistinei ca modulator al fenotipului CMN respectiv, efectele pro-inflamatorii exercitate. Intrucat rezistina si fractalkina sunt prezente in leziunea aterosclerotica iar receptorul CX3CR1 este predominant asociat CMN am emis ipoteza ca rezistina poate fi inductor al expresiei de fractalkina (CX3CL1) si contribuie pe aceasta cale atat la modularea fontipica (pro-inflamatorie) a CMN cat si la intensificarea transmigrarii monocitelor.

Rezultatele arata ca rezistina poate induce semnificativ expresia CX3CL1 si CX3CR1 in CMN vasculare ceea ce demonstreaza ca, rezistina poate fi o citokina operatioanala in inducerea statusului pro-inflamator si contribuie astfel la dezvoltarea aterosclerozei. Intrucat receptorul rezistinei in celulele vasculare nu este inca cunoscut rezultatele experimentale din acest studiu demonstreaza ca la nivelul CMN vasculare atat anti-TLR4 cat si PTX inhiba expresia CX3CL1 si CX3CR1 indusa de rezistina, ceea ce sugereaza ca rezistina poate utiliza atat receptorii TLR4 cat si receptorii proteinelor-Gi in modularea acestor molecule.

Pe langa acestea, rezultatele acestui studiu arata ca rezistina activeaza p38MAPK si STAT3 dar nu ERK1/2. Inhibitorii farmacologici ai p38MAPK reduc semnificativ expresia CX3CL1 si CX3CR1 in CMN activate cu rezistina. Activarea p38MAPK de catre rezistina poate induce translocarea subunitatilor p65 si c-Jun a factorilor de transcriptie NF-kB si AP-1. Mai mult, inhibitorul *SP100030* (dublu inhibitor al NF-kB si AP-1) reduce fractalkina si CX3CR1,

demonstrand rolul NF-kB si AP-1 in reglarea lor. Silentierea p65 si c-Jun anterioara activarii cu rezistina, reduce semnificativ expresia celor doua molecule. Coroborate aceste rezultate indica ca NF-kB si AP-1 sunt implicate in actiunea rezistinei asupra expresiei de fractalkina si a receptorului specific la nivelul CMN vasculare. De asemenea, rezultatele arata ca blocarea caii JAK/STAT cu inhibitor specific *WP-1066* dar si silentierea STAT1/STAT3 cu ODN specifice, reduc expresia CX3CL1 si a receptorului sau, ceea ce demonstreaza ca factorii de transcriptie STAT sunt implicati in acest proces aditional la actiunea NF-kB si AP-1.

Experimentele de chemotaxie realizate prin sistemul xCELLigence demonstreaza ca fractalkina indusa de rezistina este functionala in transmigrarea monocitelor. Mediul conditionat colectat de la CMN activate cu rezistina confera un semnal chemoatractant puternic pentru monocite. Aditia anticorpului anti-CX3CL1 in mediul conditionat al CMN activate cu rezistina, reduce semnificativ numarul monocitelor transmigrate. Toate aceste rezultate arata ca efectul chemotactic al fractalkinei solubile eliberate in mediul conditionat este dependent de expresia/interctia cu receptorul CX3CR1 de pe monocite.

In **capitolul IV** am conceput experimente pentru a evidentia daca activitatea promotorului si expresia CX3CL1 este reglata prin mecanisme directe/indirecte de factorii de transcriptie NF-kB, AP-1 si STAT1/STAT3.

Analiza ***in silico*** a **promotorului uman *CX3CL1*** indica existenta elementelor promotor-specifice *TATA* si *CCAC box*. Aditional, au fost identificate situsuri de legare relevante pentru fiziologia si patologia vasculara ce includ ***NF-kB***, ***AP-1***, ***GAS*** (STAT1/STAT3), ***C/EBP***, ***GATA***, si ***GAGA***. Analiza mutantilor de deletie a CX3CL1 arata ca NF-kB, AP-1 si STAT1/STAT3 nu sunt esentiali in activitatea de baza a promotorului in CMN dar au rol in modularea CX3CL1 ca raspuns la stimuli inflamatori. Pentru a investiga functia elementelor NF-kB, AP-1 si GAS am analizat activitatea nucleara a factorilor de transcriptie prin tehnica ChIP in CMN tratate cu rezistina. Rezultatele arata ca secventele prevazute prin analiza *in silico* corespunzatoare AP-1, NF-kB si GAS formeaza complexe de legare cu c-Jun, p65 si STAT1/STAT3. Rezultatele obtinute arata numeroase interactii *non-canonice* intre proteinele p65/NF-kB, c-Jun/AP-1 si STAT1/STAT3.

In concluzie, aceste rezultate prezinta pentru prima data o caracterizare a promotorului CX3CL1uman. Rezultatele demonstreaza ca interactia complexa intre NF-kB, AP-1 sau STAT1/3 si caile asociate regleaza direct/indirect CX3CL1, mecanism ce poate fi responsabil de supraexpresia CX3CL1 in placa aterosclerotica umana. Acesti factori de transcriptie sunt esentiali pentru transducerea multor factori de risc cardiovascular iar modularea reglatorilor “up-stream” de promotorul CX3CL1 poate reprezenta o strategie farmacologica eficienta pentru a atenua actiunea puternic proinflamatorie a CX3CL1.

Coroborate toate aceste rezulate obtinute in partea “ Contributii originale”subliniaza importanta interactiilor complexe dintre factorii de transcriptie, coactivatori, si/sau corepresori in

supraexpresia fractalkinei. Inhibarea chimica a cailor kinazice “up-stream” (p38MAPK, JNK si JAK2) precum si suprimarea factorilor de transcriptie NF-kB, AP-1 si STAT1/3 prin tehnologia ARN de interferenta reduc expresia de fractalkina indusa depndent de rezistina sau glucoza crescuta. Toate aceste rezultate arata importanta cailor de semnalizare ***NF-kB***, ***AP-1*** si ***STAT1/3*** in reglarea expresiei CX3CL1, ceea ce explica prezenta ei in leziunea umana aterosclerotica dependent de expresia rezistinei secretata la nivelul leziunii prin macrofage sau conditiile hiperglicemice din diabet.

Intrucat teza aceasta are un caracter predominant fundamental, scopul final al acestor studii este de natura aplicativa. Seria de experimente realizate pot contribui la elucidarea mecanismelor inflamatorii de la nivelul placii aterosclerotice, respectiv la optimizarea unor terapii care sa reduca dinamica proceselor inflamatorii.

Numar de figuri in prima parte - 27

Numar de figuri originale (partea a doua) - 34

Indicatii bibliografice - 373

Lucrari publicate in reviste internationale cotate ISI - 9

Lucrari publicate in reviste nationale recunoscute CNCSIS – 1

Prezentari orale la manifestari stiintifice internationale - 2

Rezumate ale lucrarilor prezentate la manifestari stiintifice internationale - 30

Rezumate ale lucrarilor prezentate la manifestari stiintifice nationale - 4

Specializari si cursuri efectuate – 5

Participarea la proiecte de cercetare - 4 nationale, 2 internationale

ACADEMIA ROMÂNĂ
Şcoala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie și Patologie Celulară ”Nicolae Simionescu”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Studiul inflamației asociate patologiei valvulare în diabet *in vivo* și în modele 3D de valvă aortică umană *in vitro*

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
m.c. AR Dr. MÂNDUȚEANU ILEANA

DOCTORAND:
CIORTAN LETIȚIA CRISTINA

București
2022

CUPRINS

Listă abrevieri....9

Introducere....12

PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAŞTERII

I. VALVA AORTICĂ – DEZVOLTARE, STRUCTURĂ ȘI CELULE REZIDENTE.... 18

I.1. Dezvoltarea valvei aortice.... 18

I.1.1. Etapa embrionară 18

I.1.2. Etapa postnatală 21

I.2. Structura macroscopică a valvei aortice adulte.... 23

I.3. Compoziția și rolul structural al matricei extracelulare (MEC).... 23

I.4. Celulele rezidente din valva aortică matură sănătoasă.... 25

I.4.1. Celule endoteliale valvulare (VEC) 25

I.4.2. Celule interstițiale valvulare (VIC).... 28

I.4.3. Celule imune 30

II. MODIFICĂRI CELULARE ȘI MOLECULARE ASOCIATE BOLII VALVEI AORTICE ÎN DIABET 32

II.1. Mecanisme patologice asociate VEC în inițierea și propagarea BVA în diabet.... 34

II.1.1. Tranziția endotelial-mezenchimală (EndMT).... 35

II.1.2. Decuplarea eNOS și stresul oxidativ 38

II. 1.3. Supraexprimarea moleculelor de adeziune și infiltrarea celulelor imune.... 39

II.1.4. Angiogeneza 42

II.2. Diferențierea patologică a VIC în valvulopatia diabetic 43

II.2.1. Tranziția qVIC în miofibroblaste (aVIC) 44

II.2.2. Tranziția qVIC în osteoblaste (obVIC).... 47

III. MODELE *IN VIVO* UTILIZATE PENTRU STUDIUL BOLII VALVEI AORTICE ÎN DIABET.... 49

III.1 Modele de diabet *in vivo* 49

III.2. Modele de BVA *in vivo*.... 51

III.3. Modele de BVA în diabet *in vivo*.... 52

IV. MODELE 3D *IN VITRO* UTILIZATE PENTRU STUDIUL BOLII VALVEI AORTICE ÎN DIABET 56

IV.1. Componenta celulară a modelelor *in vitro* de BVA.... 56

IV.1.1. Celule de origine animală 57

IV.1.2. Celule umane 58
IV.2. Modele 3D obținute din țesuturi native 59
IV.2.1 Hidrogeluri obținute din țesut nativ 60
IV.2.1.1. Prorietățile hidrogelurilor obținute din țesut nativ 61
IV.2.1.2. Interacția hidrogelurilor din țesut nativ cu celulele 63
IV.2.1.3. Hidrogeluri obținute din țesut nativ utilizate pentru studiul BVA 64
IV.2.2 Structuri native decelularizate utilizate ca suport pentru recelularizare 65
IV.3. Modele 3D obținute din hidrogeluri pe bază de polimeri naturali 66
IV.4. Modele 3D pe bază de polimeri sintetici 67

PARTEA II – CONTRIBUȚII ORIGINALE

I. DIABETUL TIMPURIU INDUCE ÎN VALVA AORTICĂ MODIFICĂRI ALE MEDIATORILOR INFLAMATORI CARE SE CORELEAZĂ CU MODIFICĂRI FUNCȚIONALE ÎNTR-UN MODEL *IN VIVO* DE ȘOARECE DIABETIC, HIPERLIPEMIC 70
I.1. Introducere şi obiective 70
I.2 Materiale și metode 72
I.2.1. Model animal 72
I.2.2. Histochimie și Imunohistochimie 73
I.2.2.1. Histochimie 73
I.2.2.2. Imunohistochimie 74
I.2.3 Analiza rezultatelor 74
I.2.3.1. Analiza imaginilor de imunohistochimie 74
I.2.3.2. Corelații 75
I.2.3.3. Analiza statistică 75
I.3. Rezultate **75**
I.3.1. Șoarecii menținuți pe dietă hiperlipemică dezvoltă diabet și depozite lipidice la nivelul valvei aortice 75
I.3.2. Mediatorii inflamatori sunt supraexprimați în celulele valvulare aortice la șoarecii diabetici menținuți pe dietă bogată în lipide 80
I.3.2.1. Diabetul timpuriu induce supraexprimarea moleculelor de adeziune de la nivelul endoteliului în valva aortică 80
I.3.2.2. Diabetul și dieta bogată în lipide modulează exprimarea markerilor de activare a VIC 83
I.3.3. Celulele valvulare implicate în EndMT se localizează în zona infiltratului lipidic din valvă la șoarecii diabetici 85
I.3.4. Mediatorii inflamației găsiți modificați în valvele murine se corelează cu markerii de remodelare și calcificare 86

I.4. Discuții ... 88
I.5. Concluzii parțiale ... 89
II. EXPUNEREA CRONICĂ LA CONCENTRAȚII CRESCUTE DE GLUCOZĂ INDUCE MODIFICĂRI PROGRESIVE ALE FENOTIPULUI INFLAMATOR AL CELULELOR VALVULARE UMANE ÎN MODELE 3D *IN VITRO* ... 90
Introducere şi obiective ... 90
II.1 Izolarea și caracterizarea celulelor valvulare primare din valve aortice umane ... 93
II.1.1. Materiale și metode ... 93
II.1.1.1. Izolarea celulelor valvulare umane primare ... 93
II.1.1.2. Imunocitochimie ... 94
II.1.2. Rezultate ... 94
II.1.2.1. Culturile pure de VIC și VEC primare umane au fost stabilite in vitro ... 94
II.1.2.2. VIC și VEC primare umane exprimă markeri celulari specifici în cultură ... 95
II.1.3. Discuții ... 97
II.1.4. Concluzii parțiale ... 97
II.2. Model *in vitro* de cuspă porcină decelularizată repopulată cu celule umane ... 98
II.2.1. Materiale și metode ... 98
II.2.1.1. Linii celulare utilizate ... 98
II.2.1.2. Protocolul de decelularizare a valvelor aortice porcine ... 98
II.2.1.3. Metode utilizate pentru repopularea cu celule umane a foițelor valvulare porcine decelularizate ... 99
II.2.1.4. Histochimie ... 102
II.2.1.5. Analiza statistică ... 103
II.2.2. Rezultate ... 103
II.2.2.1. Cuspele porcine decelularizate își păstrează compoziția MEC ... 104
II.2.2.2. Evaluarea potențialului de repopulare a cuspelor cu celule umane ... 106
II.2.2.2. 1. Repopulare cu fibroblaste și CEV ... 106
II.2.2.2.2. Repopulare cu VIC ... 109
II.2.2.2.3. Repopulare cu VIC și VEC ... 112
II.2.3. Discuții ... 117
II.2.4. Concluzii parțiale ... 117
II.3. Modele bioprintate bazate pe hidrogeluri comerciale ... 118
II.3.1. Materiale și metode ... 118
II.3.1.1. Linii celulare utilizate ... 118
II.3.1.2. Hidrogeluri comerciale utilizate în studiu ... 118
II.3.1.3. Imunohistochimie ... 119
II.3.1.4. MTT ... 119
II.3.1.5. Analiza statistică ... 120

II.3.2. Rezultate 120
II.3.2.1. Hidrogel BioInk-RegenHU 120
II.3.2.2. Hidrogeluri CellInkRGD și Gell4Cell 125
II.3.3. Discuții 127
II.3.4. Concluzii parțiale 127
II.4. Expunerea cronică la concentrații crescute de glucoză induce un fenotip inflamator în celulele valvulare aortice umane într-un model 3D bazat pe gelatină metacrilată (GP-1) 128
II.4.1. Materiale și metode 128
II.4.1.1. Celule utilizate în studiu 128
II.4.1.2. Protocolul obținere hidrogel GP-1 bazat pe gelatină metacrilată, cu celule încapsulate 129
II.4.1.2.1. Obținerea hidrogelului GP-1 129
II.4.1.2.2. Obținerea modelului pe bază de GP-1 cu celule valvulare umane încapsulate 129
II.4.1.3 Imunohistochimie 130
II.4.1.4. Izolarea celulelor din construcții 3D prin digestie enzimatică 131
II.4.1.5. MTT 131
II.4.1.6. Determinarea exprimării genice prin tehnica RT-PCR 131
II.4.1.7. Determinarea exprimării proteice prin tehnica WB 132
II.4.1.8. Determinarea proteinlor secretate prin tehnica ELISA 132
II.4.1.9. Analiza rezultatelor 133
II.4.1.9.1. Analiza imaginilor de imunohistochimie – construcți 3D 133
II.4.1.9.2. Analiza statistică 133
II.4.2. Rezultate 133
II.4.2.1. Hidrogelul GP-1 prezintă biocompatibilitate cu celulele valvulare umane primare și favorizează fenotipul neactivat al VIC 134
II.4.2.1.1. Caracterizarea celulelor valvulare cultivate în hidrogel GP-1 134
II.4.2.1.2. Evaluarea viabilității celulelor valvulare cultivate în hidrogel GP-1 137
II.4.2.1.3. Evaluarea fenotipului VIC cultivate în hidrogel GP-1 137
II.4.2.2. Concentrațiile crescute de glucoză cresc exprimarea de citokine și chemokine cu efect proinflamator în VIC și VEC 139
II.4.2.3. Expunerea cronică la concentrații crescute de glucoză crește exprimarea genică de vWF în VEC și exprimarea genică a moleculelor de adeziune VCAM-1 și E-selectină în VEC și VIC 141
II.4.2.4. Concentrația crescută de glucoză activează calea de semnalizare a PKC în celulele valvulare, iar blocarea acesteia scade semnificativ nivelul de IL-1β secretat în mediu 142
II.4.3. Discuții 144
II.4.4. Concluzii parțiale 145

II.5. Concentrațiile crescute de glucoză induc tranziția endotelial-mezenchimală în VEC și cresc exprimarea de mediatori ai inflamației în celulele valvulare într-un model *in vitro* bazat pe hidrogel obținut în laborator din rădăcină aortică porcină decelularizată (HDRA).... 146

II.5.1. Materiale și metode 146

II.5.1.1. Celule utilizate în studiu 146

II.5.1.2. Protocol obținere hidrogel derivat din radacina aortica porcină (HDRA), cu celule încapsulate 147

II.5.1.2.1. Obținerea HDRA 147

II.5.1.2.2. Obținerea modelului pe bază de HDRA cu celule valvulare umane încapsulate 147

II.5.1.3. Electroforeză pentru determinarea compoziției proteice în elemente de MEC a HDRA dezvoltat 148

II.5.1.4. Histochimie și Imunohistochimie 148

II.5.1.4.1. Histochimie 148

II.5.1.4.2. Imunohistochimie 149

II.5.1.5. Izolarea celulelor din construcții 3D prin digestie enzimatică 150

II.5.1.6. MTT 150

II.5.1.7. LDH 150

II.5.1.8. Determinarea exprimării genice prin tehnica Real-Time PCR 151

II.5.1.9. Determinarea proteinlor secretate prin tehnica ELISA 151

II.5.1.10. Pregătirea probelor pentru TEM 152

II.5.1.11. Protocol adeziune monocite în flux la construcți HDRA cu VEC 152

II.5.1.12. Analiza rezultatelor 153

II.5.1.12.1. Analiza imaginilor de imunohistochimie – construcți 3D 153

II.5.1.12.2. Analiza statistică 153

II.5.2. Rezultate 153

II.5.2.1. HDRA prezintă compoziție proteică similară cu cea a valvei native și biocompatibilitate ridicată cu celulele valvulare umane primare 154

II.5.2.1.1. Evaluarea compoziției în elemente ale MEC a HDRA 154

II.5.2.1.2. Evaluarea biocompatibilității HDRA cu celulele valvulare umane 155

II.5.2.1.3. Caracterizarea histologică și imunohistologică a modelului de co-cultură în HDRA 156

II.5.2.1.4. Evaluarea viabilității celulelor valvulare cultivate în HDRA 157

II.5.2.2. Tranziția EndMT a celulelor valvulare endoteliale aortice umane este indusă de concentrația ridicată de glucoză 158

II.5.2.3. Concentrația crescută de glucoză crește exprimarea de ET-1 în celulele valvulare endoteliale aortice umane 165

II.5.2.4. Blocarea receptorilor endotelinei ET-A și ET-B duce la scăderea concentrației de IL-1β și MCP-1 secretat de către celulele valvulare din construcți VIP în condiții de glucoză crescută 167

II.5.2.5. Concentrațiile crescute de glucoză induc disfuncția endoteliului valvular prin creșterea adeziunii monocitelor la VEC în condiții dinamice 168

II.5.3. Discuții 170

II.5.4. Concluzii parțiale 172

Concluzii generale 173

Bibliografie 176

Rezultate program doctoral 203

Cuvinte cheie: Valvă aortică, inflamație, diabet, glucoză, hidrogel

Boala valvei aortice (BVA) reprezintă o problemă de sănătate la nivel mondial și una dintre cauzele majore ale mortalității în rândul persoanelor de peste 65 de ani (Nkomo, Gardin et al. 2006, Yadgir, Johnson et al. 2020, Coffey, Roberts-Thomson et al. 2021). Pentru mult timp BVA a fost considerată un proces pasiv, degenerativ, deoarece progresia bolii se întinde pe parcursul a zeci de ani. În prezent, boala este recunoscută drept un proces activ, condus de inflamația cronică, asemănător în fazele inicipiente cu ateroscleroza. Terapia cu statine s-a dovedit însă ineficientă în ameliorarea BVA, arătând astfel că mecanismele de progresie ale celor două patologii sunt diferite(Cowell, Newby et al. 2005).

Evoluția BVA cuprinde *scleroza timpurie*, caracterizată prin îngroșarea cuspelor dar fără consecințe asupra funcției, și *stenoza târzie*, când funcția valvei este compromisă din cauza depozitelor extinse de calciu. Detecția clinică a valvelor stenotice se face prin identificarea unui murmur cardiac și este confirmată ecocardiografic, bazându-se astfel pe simptomele din stadiile avansate când structura și funcția valvei sunt afectate(Lindman, Bonow et al. 2013). În prezent, nu există markeri predictivi sau terapii farmacologice pentru gestionarea BVA, iar singura opțiune de tratament pentru valvele aflate în stadii avansate de calcificare este înlocuirea chirurgicală a acestora cu proteze mecanice sau biologice, care la rândul lor se pot calcifica. Se estimează că, odată cu îmbătrânirea populației, incidența BVA o să crească semnificativ, mai ales în țările dezvoltate, devenind o importantă problemă socio-economică(Kodali, Velagapudi et al. 2018). Diabetul este unul dintre factorii de risc cunoscuți pentru dezvoltarea BVA, iar acesta a fost asociat recent cu progresia accelerată a bolii și gravitatea simptomelor la pacienții cu stenoză aortică moderată(Han, Shi et al. 2021, Manduteanu, Simionescu et al. 2021, Natorska 2021). Astfel, în diabet, valva aortică (VA) se calcifică accelerat, ceea ce duce la disfuncția valvei și a inimii prin mecanisme care sunt incomplet înțelese.

Prezenta teză a fost structurată în două părți, și anume partea I, “Stadiul actual al cunoaşterii”, unde este prezentată o analiză a literaturii de specialitate necesară pentru a pune în context cercetarea și partea II, “Contribuții originale”, unde este descrisă cercetarea experimentală propriu-zisă.

Astfel, în **prima parte** sunt abordate aspecte legate de dezvoltarea valvei în stadiile embrionare și postnatale, structura și arhitectura valvei aortice, celulele rezidente si rolul lor fiziologic, mecansimele declanșate la nivel celular în patologia valvulară asociată diabetului și o trecere în revistă a modelelor *in vivo* și *in vitro* utilizate pentru studiul valvulopatiei aortice.

Dezvoltarea, structura și celulele rezidente din valva aortică

Valva aortică (VA) este una dintre cele patru valve de la nivelul inimii care asigura curgerea unidirecțională a sângeluri din ventriculul stâng către aortă. **Dezvoltarea VA** are loc atât în perioada embrionară, în fazele de formare ale structurilor anatomice la nivelul inimii, cât și în perioada postnatală, când are loc stabilizarea populațiilor celulare și definitivarea arhitecturii valvei. În etapa embrionară, formarea valvelor cardiace are loc atunci când la nivelul tubului cardiac se formează pernuțele endocardice prin semnalizarea mediată de proteinele morfogenetice osoase (BMP-uri) din superfamilia factorilor de creștere transformanți β (TGF-β). O sub-populație de celule endoteliale endocardice intră în tranziție endotelial-mezenchimală (EndMT) și migrează în jeleul cardiac unde proliferează și dă naștere populației de celule valvulare interstițiale (VIC) din pernuțele endocardice (O'Donnell and Yutzey 2020). În aceste valve embrionare începe un proces complex de remodelare orchestrat de către VIC, care este finalizat în perioada postnatală când valva capătă structura trilaminară caracteristică, iar populația de celule rezidente se stabilizează(Hinton, Lincoln et al. 2006, Nordquist, LaHaye et al. 2018).

Cuspele valvei mature sunt structuri avasculare, la nivelul cărora se disting trei straturi cu **organizare și compoziție** diferită în elemente de matrice extracelulară (MEC): (1) fibrosa – situat spre aortă, și care este compus în principal din fibre de colagen de tip I și III orientate circumferențial, conferind rezistență mecanică valvei; (2) ventricularis – situat spre ventricul, fiind în principal compus din fibre de elastină orientate radial care conferă elasticitate țesutului; (3) spongiosa – stratul din mijloc, compus în principal din proteoglicani (PG), glicozaminoglicani (GAG) și fibre de colagen, care absoarbe șocurile mecanice și servește drept interfață între celelalte două straturi.

Cele trei straturi ale cuspelor VA sunt populate de **celulele rezidente valvulare**, iar studii recente au arătat ca acestea sunt în proporție de 80-85% VIC (negative pentru CD31 și CD45), 5-7% VEC și ∼10% celule de origine imună (Hulin, Anstine et al. 2018, Hulin, Hortells et al. 2019).

Celulele endoteliale valvulare (**VEC**) sunt dispuse sub forma unui monostrat compact care căptușește la exterior cele trei cuspe ale VA și asigură interfața de comunicare dintre sânge și interstițiul valvular. Principala funcție a endoteliului este cea de barieră selectivă și neaderentă, care intermediază transportul de oxigen și nutrienți din sânge către spațiul interstițial, dar și răspunsul imun. VEC sunt o populație de celule endoteliale diferită de celulele endoteliale vasculare și prezintă heterogenitate ridicată: VEC de pe cele două

fețe ale cuspelor sunt diferite, astfel că endoteliul de pe fața ventricularis exprimă inhibitori ai calcificării cardiovasculare iar cel de pe fața fibrosa prezintă profil puternic antioxidativ și exprimare crescută a sintazei endoteliale a oxidului nitric (eNOS)(Simmons, Grant et al. 2005). În patologie, VEC sunt implicate în inițierea și progresia bolii VA prin recrutarea de celule imune, dereglarea semnalizării protective a oxidului nitric (NO) sau prin inițierea tranziției endotelial-mezenchimală (EndMT) (Ma, Zhao et al. 2020, Majumdar, Manivannan et al. 2021).

În valva adultă sănătoasă, populația de celule interstițiale constă majoritar din **VIC** neactivate (qVIC) distribuie în toate cele 3 straturi ale cuspelor, resposabile de menținerea structurii trilaminare a MEC (Bogdanova, Zabirnyk et al. 2019). Celulele interstițiale formează în valvă o rețea celulară extinsă care facilitează răspunsul unitar și transmiterea rapidă de informații între membrii rețelei. Ca răspuns la stimulii mecanici sau patologici, qVIC se pot diferenția în: (1) aVIC, care exprimă metaloproteaze și sunt implicate în remodelarea matricei extracelulare, provocând scleroza timpurie sau (2) obVIC, implicate în acumularea depozitelor de calciu (Rutkovskiy, Malashicheva et al. 2017).

Celulele imune se stabilesc în valvă încă din fazele de dezvoltare a inimii și reprezintă a treia populație majoritară din VA. În valvele murine au fost identificate limfocite T, celule dendritice, mastocite și două subpopulații de macrofage: Mφ1 și Mφ2 (Hulin, Hortells et al. 2019). Deși rolul celulelor imune în menținerea homeostaziei VA nu a fost încă studiat și descris în detaliu, se presupune că acestea patrulează țesutul valvular, fagocitează celule apoptotice sau agenții patogeni și migrează în organele limfoide unde inițiază răspunsul imun prin prezentarea antigenului (Hajdu, Romeo et al. 2011).

Implicarea diabetului în patologia BVA

Diabetul zaharat induce și accentuează răspunsul inflamator și acumularea de lipide asociate cu inițierea și progresia BVA (Manduteanu, Simionescu et al. 2021), iar studiul CANHEART a implicat diabetul ca factor semnificativ de risc în dezvoltarea stenozei aortice (Yan, Koh et al. 2017). Diabetul nu numai că predispune la BVA, dar se asociază de asemenea cu progresia accelerată a bolii și gravitatea simptomelor la pacienții cu stenoză aortică moderată (Aronow, Ahn et al. 2001). Patologia diabetului asociat cu alte boli cardiovasculare este complexă și se datorează în parte efectelor hiperglicemiei, care duce la creșterea generării speciilor reactive de oxigen (ROS) și promovarea exprimării de citokine și chemokine cu efect proinflamator (Dludla, Joubert et al. 2017, Wang, Liu et al. 2021).

Nivelul crescut al proteinei C reactive și hiperlipemia asociată diabetului favorizează inflamația cronică (Dongway, Faggad et al. 2015). Există numeroase dovezi care implică

proteine al căror nivel este crescut în diabet (TNF-α, MCP-1, IL-1β) în patologia valvei aortice (Keane, Calton et al. 2017), astfel că se poate specula că **mediul inflamator** produs în diabet declanșează cel puțin în parte mecanismele responsabile pentru disfuncția celulelor valvulare. În diabetul de tip 2, hiperglicemia se asociază de asemenea cu producția crescută de ROS și adeziunea monocitelor la endoteliu prin inhibarea producției de NO și creșterea nivelului de endotelină-1, E-selectină, ICAM-1 și VCAM-1. Monocitele ajunse în spațiul subendotelial se diferențiază în macrofage care secretă citokine proinflamatorii și înglobează LDL modificat, transformându-se apoi în celule spumoase (Manduteanu, Voinea et al. 1999, Nandy, Janardhanan et al. 2011, Padilla, Carpenter et al. 2018, Meza, La Favor et al. 2019). Inflamația precede calcificarea, iar în zonele calcificate din valvă au fost identificate celulele imune infiltrate. Se cunoaște că populația de macrofage din valvele calcificate este mai numeroasă decât cea din valvele normale și exprimă atât markeri caracteristici Mφ1, cât și Mφ2 (Li, Qiao et al. 2017).

În valvele stenotice provenite de la pacienți diabetici, exprimarea NF-κB și a FII și FXa în fibrosa este crescută față de valvele de la pacienți fără diabet. În plus, experimentele *in vitro* au confirmat că glucoza crescută provoacă inflamația VIC primare prin intermediul semnalizării mediate de NF-κB, ducând la calcificarea celulară (Kopytek, Mazur et al. 2021).

În valvele calcificate a fost evidențiată exprimarea redusă a VE-caderinei în fibrosa și a fost identificată în subendoteliu o populație de celule care co-exprimă α-SMA și CD31, dar nu și markerul hematopoietic CD45, sugerând ca aceste celulele provin din EndMT. Această populație celulară care prezintă și nivel crescut de NFκB nuclear a fost identificată doar în fibrosa, și se localizează distal față de zona calcificată (Mahler, Farrar et al. 2013). De asemenea, anterior s-a arătat că celulele endoteliale izolate din valvele calcificate sunt mai predispuse diferențierii osteogenice *in vitro* față de celulele endoteliale vasculare (Ma, Zhao et al. 2020). Se cunoaște că diabetul se asociază cu inflamația cronică, iar mediatorii pro-inflamatori TNF-α, IL-6, LPS, IFN-γ și TGF-β au fost implicați în activarea EndMT în VEC (Mahler, Farrar et al. 2013, Ma, Sanchez-Duffhues et al. 2020). *In vitro*, TNF-α și IL-6 au indus în celulele endoteliale valvulare aortice porcine (PAVEC) cultivate pe hidrogeluri 3D modificări asociate EndMT prin calea de semnalizare a factorului de transcripție NFκB: (1) scăderea exprimării CD31 și a VE-caderinei, (2) migrarea celulelor în matricea de colagen și (3) exprimarea de α-SMA (Mahler, Farrar et al. 2013).

Plasticitatea VIC și implicațiile pentru studiul BVA

MEC reglează fenotipul celulelor valvulare rezidente prin intermediul integrinelor, contribuie la menținerea tensiunii bazale celulare și oferă celulelor informații poziționale

(Santa-Cruz Mateos, Valencia-Exposito et al. 2020). De asemenea, MEC poate funcționa ca un rezervor de semnale biologice prin intermediul proteoglicanilor, care pot sechestra local molecule de semnalizare. Datorită rolului complex pe care MEC îl are în homeostazie, orice modificare la acest nivel poate conduce la patologie. *In vitro*, VIC tranziționează spontan în miofibroblaste (aVIC) și prezintă capacitate ridicată de contracție, atunci când sunt cultivate pe substrat rigid sau sunt stimulate cu citokine specifice (TGF-β), capacitate migratorie și proliferativă(Liu and Gotlieb 2008, Huang, Yang et al. 2012, Ma, Killaars et al. 2017). Studiile unde celulele valvulare au fost cultivate pe matrici tridimensionale de compoziție și rigiditate diversă, au evidențiat rolul semnificativ pe care substratul îl are în modularea fenotipului celular, cu implicații în patologia valvulară (Hutson, Marohl et al. 2016, Rutkovskiy, Malashicheva et al. 2017, Bogdanova, Zabirnyk et al. 2022). Plasticitatea VIC se păstrează deci și în cultură, astfel că una dintre cele mai mari probleme în studiul patologiei valvei aortice este lipsa unui model experimental *in vitro* care să replice cât mai apropiat compoziția și arhitectura țesutului valvular nativ.

În valva sănătoasă **tranziția qVIC în aVIC** reprezintă un proces implicat în menținerea arhitecturii valvei prin secreția componentelor MEC (colagen, fibronectină, condroitin sulfat, etc.) și de enzime care degradează aceste componente (MMP-uri, catepsine). Odată terminată remodelarea MEC, aVIC sunt eliminate prin apoptoză. În patologie, această semnalizare este însă afectată și aVIC continuă sinteza elementelor de MEC, cauzând fibrozarea țesutului și calcificarea distrofică. Atunci când devin activate, celulele interstițiale prezintă fibre de stres, exprimare crescută de α-SMA, miozina mușchiului neted, proteina specifică fibroblastelor (FSP-1) sau vimentină, dar și proteine ale MEC și citokine. Printre inductorii de activare a VIC se numără modificările asociate MEC, stresul mecanic sau TGF-β (Ma, Killaars et al. 2017, Goody, Hosen et al. 2020, Di Vito, Donato et al. 2021).

Tranziția qVIC în obVIC are loc în prezența de factori care promovează osteogeneza sau condrogeneza. obVIC sunt implicate activ în procesul de calcificare a valvei și sunt responsabile pentru stenoza târzie. În acest stadiu, comportamentul celular este guvernat de factorul de transcripție RUNX2 și de proteinele morfogenetice osoase (BMPs), iar obVIC secretă o serie de proteine exprimate în țesutul osos, precum osteopontină, osteocalcină și fosfatază alcalină (Yip, Chen et al. 2009). Rezultatele noastre recente au arătat că hiperglicemia induce supraexprimarea moleculelor osteogene BMP-2, BMP-4 și TGF-β în celulele valvulare aortice umane cultivate în modele 3D pe bază de gelatină metacrilată, cu efect asupra semnalizării SMAD1/5/8/9 și a exprimării factorului de

transcripție RUNX2, implicând astfel diabetul ca și contribuitor la calcificarea valvei aortice (Vadana, Cecoltan et al. 2020).

Studiul BVA in vivo și in vitro

Rolul celulelor valvulare în patologia valvei aortice în diabet încă nu este pe deplin elucidat și este studiat în prezent în mai multe tipuri de modele *in vivo* (Sider, Blaser et al. 2011, Puperi, Kishan et al. 2016, Jung, Ahmad et al. 2022) și *in vitro* (Hjortnaes, Goettsch et al. 2016, Porras, Westlund et al. 2018, Zabirnyk, Perez et al. 2020, Kruithof, van de Pol et al. 2021).

Patologia BVA în diabet este extrem de complexă, astfel că este necesar un **model *in vivo*** care să poată reda cât mai fidel ambele patologii. Modelele *in vivo* de diabet presupun utilizarea de animale cu predispoziție de a dezvolta diabet sau inducerea diabetului cu ajutorul agenților chimici (diabetogeni) care distrug celulele β-pancreatice. Cei mai utilizați agenți diabetogeni sunt streptozotocina și alloxan-ul, care sunt preluați în celulele β-pancreatice prin intermediul transportotului de glucoză GLUT2, unde generează ROS și radicali liberi, provocând fragmentarea ADN-ului și apoptoza celulelor.

În literatura de specialitate sunt descrise numeroase modele de diabet *in vivo*, dar pentru studiul BVA modelele curente prezintă limitări importante la nivel de recapitulare a caracteristicilor patologiei umane. De asemenea, modelele de BVA în diabet sunt și mai puține, iar fazele incipiente de apariție a leziunilor la nivelul VA au fost descrise majoritar *in vivo* la nivel ultrastructural (Filip, Nistor et al. 1987, Simionescu, Popov et al. 1996, Tucureanu, Filippi et al. 2019).

I*n vivo,* s-a arătat recent într-un model de șoarece dislipidemic predispus la dezvoltarea diabetului de tip 2 ($LDLr^{-/-}$/$ApoB^{100/100}$/IGF-II) că diabetul indus prin dietă provoacă mai rapid stenoza aortică (SA) și crește exprimarea la nivel de ARNm a genelor osteogenice față de șoarecii nediabetici ($LDLr^{-/-}$/$ApoB^{100/100}$) (Le Quang, Bouchareb et al. 2014). Similar, șoarecii $LDL^{r-/-}ApoB^{100/100}$ menținuți pe dietă diabetogenică/procalcifică timp de 12 luni prezintă depozite de calciu la nivelul VA și incidență de două ori mai mare a stenozei aortice confirmată prin modificarea parametrilor hemodinamici (Scatena, Jackson et al. 2018). Totuși, atunci cand diabetul este indus prin injectarea de streptozotocină într-un model de hamster hiperglicemic-hiperlipemic, rezultatele arată că valva aortică (VA) este primul teritoriu vascular afectat de diabet și hiperlipemie (HD), după doar 2 săptămâni de la inducerea diabetului. În valvele aortice de la hamsterii HD au fost identificate modificări ultrastructurale ale VEC (creșterea abundenței de organite biosecretorii, a microfilamentelor și microtubulilor) care s-au asociat cu hiperplazia membranei bazale la nivelul căreia au fost

identificate lipoproteine de joasă densitate (LDL) oxidate, sugerând că hiperglicemia induce în faza inițială disfuncția VEC (Simionescu, Popov et al. 1996).

In vitro, comportamentul celulelor interstițiale valvulare este influențat semnificativ atât de substratul pe care acestea sunt cultivate, cât și de arhitectura modelului de cultură. Culturile convenționale bi-dimensionale sunt cel mai puțin reprezentative pentru situația *in vivo,* dar sunt cel mai des utilizate pentru studiul VIC datorită ușurinței de stabilire a culturii. Studiile au arătat că, atunci când VIC sunt cultivate pe substrat rigid cum este polistirenul din plăcile de cultură, tranziționează spontan în miofibroblaste (Ma, Killaars et al. 2017). Deoarece a devenit evident rolul esențial pe care MEC îl are în reglarea funcției și disfuncției VIC (Gould, Matherly et al. 2014), un pas suplimentar față de cultura 2D a fost acoperirea suprafeței de cultură cu proteine ale MEC, iar acest tip de studii a furnizat informații importante legate de modul în care fenotipul VIC este reglat de substrat (Porras, van Engeland et al. 2017). Dintre toate elementele de matrice testate, acoperirea cu laminină a provocat agregarea VIC sub formă de noduli, iar colagenul de tip I a promovat un fenotip neactivat al VIC (Rodriguez and Masters 2009). Astfel, cercetările *in vitro* au continuat în ultimii ani cu tentative de a identifica un substrat tridimensional potrivit la nivel de compoziție sau arhitectură care să mențină fenotipul neactivat al VIC (qVIC), cu implementarea co-culturilor VIC-VEC și, nu în ultimul rând, cel mai recent, cu utilizarea de celule endoteliale valvulare umane.

Modelele 3D *in vitro* reprezintă o alternativă mai reprezentativă din punct de vedere al caracteristicilor structurale și funcționale ale mediului celular nativ, favorizând interacția cu celulele învecinate sau componentele MEC și ghidând comportamentul celular (Kaushik, Ponnusamy et al. 2018, Hong, Kim et al. 2019).

Modelele *in vitro* pentru studiul patologiei VA sunt realizate cu celule izolate de la pacienți sau provenite de la animale de mari dimensiuni care dezvoltă patologie similară cu cea umană, dintre care cele mai utilizate sunt cele porcine (Bowler and Merryman 2015). Deși sunt similare în multe privințe celulelor umane, celulele valvulare interstițiale porcine (PVIC) reprezintă totuși un model limitat *in vitro*, mai ales dacă sunt folosite la pasaje mari. Se cunoaște că atunci când sunt menținute în cultură pe termen lung, 20% dintre PVIC prezintă inhibiție de contact și au comportament instabil. De asemenea, potențialul de calcificare al PVIC scade după trei pasaje de la izolare (Chen, Yip et al. 2009). Pe de altă parte, utilizarea celulelor umane este limitată de disponibilitatea materialului biologic. Celulele umane sunt de cele mai multe ori extrase din probele de valve explantate de la pacienții cu stadii avansate de calcificare a valvei, iar celulele control sunt obținute doar de

la pacienții cu insuficiență aortică sau care suferă transplant de inimă (Goody, Hosen et al. 2020).

Un alt element esențial pentru replicarea condițiilor din VA *in vitro* este utilizarea unei co-culturi de VIC și VEC, pentru studiul interacției între cele 2 tipuri celulare. Numeroase studii au asociat cultivarea PVIC în prezența PVEC cu inhibarea tranziției lor în aPVIC sau obPVIC (Butcher and Nerem 2006, Kennedy, Hua et al. 2009, Richards, El-Hamamsy et al. 2013, Gould, Matherly et al. 2014). De asemenea, disfuncția sau denundarea endoteliului a fost semnalată drept eveniment de inițiere a transformării patologice a VIC (Hulin, Anstine et al. 2018, Hulin, Hego et al. 2018), făcând evident faptul că cele două populații celulare își reglează reciproc comportamentul.

Modele 3D obținute din țesuturi native

Multe dintre modelele 3D *in vitro* își au originea în ingineria tisulară, unde principalul obiectiv este acela de a dezvolta o variantă biologică de proteză a valvei. În acest scop, au fost testate din punctul de vedere al compatibilității cu celulele valvulare o varietate de metode și materiale sintetice sau naturale. Sistemele care mimează MEC nativă sunt de preferat, deoarece furnizează un mediu care replică arhitectura și condițiile din valvă (sechestrarea factorilor de creștere și a altor molecule, adeziunea celulară etc.) (Scott, Simon et al. 2021). Una dintre variantele utilizate cu succes pentru cultura tridimensională a celulelor *in vitro* sunt hidrogelurile obținute din polimeri naturali (colagen, gelatină) sau din țesuturi decelularizate. Țesuturile decelularizate pot la rândul lor să fie (1) repopulate cu celule, sau (2) procesate pentru obținerea hidrogelurilor din MEC nativă.

Hidrogelurile reprezintă rețele polimerice puternic hidratate care își păstrează integritatea structurală atunci când lanțurile polimerice, care pot fi de natură sintetică sau naturală, sunt polimerizate prin metode fizice sau chimice. Hidrogelurile sunt considerate analogul MEC native datorită proprietăților de a reține volume mari de fluide la interior, al elasticității, dar și a faptului că interfața dintre hidrogel și fluide se aseamănă cu cea observată în majoritatea țesuturilor moi (Geckil, Xu et al. 2010). Avantajele modelelor de cultură 3D au devenit evidente în ultimii ani, astfel că în prezent se încearcă dezvoltarea de hidrogeluri compatibile pentru cultura celulelor valvulare umane. În trecut, diferite proteine sau amestecuri proteice (Matrigel) prezente în matricea valvulară au fost utilizate pentru cultura celulelor valvulare, rezultatele fiind promițătoare. În prezent, utilizarea hidrogelurilor obținute din MEC nativă pentru studiul *in vitro* al BVA este încă foarte limitată. Rezultate promițătoare au fost obținute în cazul unui hidrogel produs din valve aortice ovine decelularizate, care păstrează o componență proteică similară cu cea din valva

nativă (colagen și laminină), dar un conținut relativ scăzut de GAG. Acest hidrogel a prezentat biocompatibilitate similară cu suporturile pe bază de colagen I la nivel de proliferare celulară și nu a avut efect citotoxic asupra VIC (Nehrenheim, Raschke et al. 2019).

Polimerii naturali precum agaroza, alginatul, colagenul, fibrina, gelatina, chitosan-ul sau acidul hialuronic pot fi de asemenea utilizați pentru obținerea de hidrogeluri și generarea de suporturi biologice. Datorită faptului că reprezintă componenta majoritară a MEC din valvă, colagenul de tip I a fost printre primele materiale utilizate pentru cultura tridimensională *in vitro* a celulelor valvulare, iar VIC crescute în geluri de colagen 2% au prezentat un fenotip mai puțin activat (Cushing, Mariner et al. 2008). În ciuda avantajelor de natură biologică ale colagenului, acest material prezintă și o serie de limitări, precum faptul că VIC contractă aceste matrici. Din aceste motive, gelatina modificată reprezintă o alternativă a utilizării colagenului. Gelatină metacrilată (GelMA) permite obținerea de hidrogeluri cu rigiditate ușor de ajustat, care favorizează adeziunea celulară și pot fi combinate ușor cu alte tipuri de materiale. Hidrogelurile de GelMA au fost utilizate cu succes pentru cultura de PVIC sau co-cultura VIC-VEC porcine în sisteme de tipul ”organ-on-a-chip” (Chen, Srigunapalan et al. 2013). Pentru obținerea de modele mai complexe, se utilizează frecvent combinația GelMA cu alte proteine ale MEC specifice VA, precum acidul hialuronic (AH).

La nivel internațional, cercetarea din domeniu se concentrează în principal pe: (1) îmbunătățirea înțelegerii proceselor biologice de bază asociate patologiei valvei aortice, inclusiv căile de semnalizare implicate și rolul inflamației în inițierea și propagarea bolii; (2) determinarea contribuțiilor unice asociate comorbidităților în BVA (3) dezvoltarea unor metode de imagistică pentru identificarea manifestărilor subclinice asociate BVA și (4) investigarea fezabilității unei intervenții farmacologice în stadiile inițiale ale BVA(Rajamannan, Evans et al. 2011).

Analiza prezentată în Partea I “Stadiul actual al cunoașterii” scoate în evidență trei probleme deosebit de importante, și anume: (1) BVA este accelerată în diabet prin mecanisme care nu au fost încă descrise, (2) modificarile moleculare din stadiile inițiale ale BVA în diabet nu au fost abordate în modelele *in vivo* și (3) modelele 3D *in vitro* existente nu includ celule valvulare umane si comunicarea dintre ele, esentiale pentru reproducerea mediului din VA nativă.

În acest context, **ipoteza** de la care a plecat prezenta această cercetare este că hiperglicemia asociată diabetului induce modificări specifice în procesul inflamator din

valva aortică, contribuind la inițierea și progresia accelerată a BVA. Astfel, obiectivul principal al studiului a fost investigarea mecanismelor prin care hiperglicemia induce și propagă inflamația celulelor valvulare aortice.

În acest sens, au fost stabilite următoarele **obiective științifice**:

1. Caracterizarea procesului inflamator în valva aortică asociat diabetului timpuriu într-un model *in vivo* de soarece diabetic, hiperlipemic;
2. Dezvoltarea de modele 3D *in vitro* populate cu celule valvulare umane și utilizarea lor pentru investigarea mecanismelor implicate în inflamația celulelor valvulare în condiții de expunere la concentrații crescute de glucoză..

Astfel, **a doua parte a tezei** constă în Contribuțiile originale aduse în vederea îndeplinirii acestor obiective, și este împărțită în două capitole.

Capitolul I a avut ca obiectiv principal investigarea mediatorilor inflamației în diabetul timpuriu în valva aortică într-un model *in vivo* de șoarece diabetic, hiperlipemic. În acest scop, au fost utilizați șoareci C57BL/6J masculi, ApoE $^{-/-}$, cărora le-a fost indus diabet de tip I prin injectarea de streptozotocină (STZ), și șoareci control (C), injectați doar cu soluție vehicul de tampon citrat. Încă din ziua 4, la nivelul VA murine au fost evidențiate leziuni cu infiltrate lipidice caracteristice etapelor timpurii ale bolii valvulare, prin colorații histologice ale lipidelor, colagenului și GAG. Analiza de imunofluorescență a arătat o creștere foarte rapidă, din ziua a 4-a, a exprimării moleculelor de adeziune P-selectină, VCAM-1, ICAM-1 și PECAM-1 la șoarecii din grupa STZ4, care s-au păstrat cel puțin la fel de ridicate în ziua 7 de la inducerea diabetului în grupa STZ7. De asemenea, markerii mezenchimali, α-SMA și FSP-1, au crescut semnificativ la șoarecii STZ4 și STZ7 față de controalele C4 și C7, sugerând rolul diabetului în activarea celulelor valvulare. Vimentina, un alt marker al celulelor mezenchimale a fost identificată ca fiind crescută semnificativ la grupele experimentale de 7 zile (C7 și STZ7) față de 4 zile, implicând dieta bogată în lipide în tranziția celulelor valvulare către fenotipuri mezenchimale.

La nivelul valvelor provenite de la șoarecii diabetici au fost identificate prin imunohistochimie celule implicate în EndMT în zona leziunilor bogate în lipide, sugerând că diabetul este implicat în supraexprimarea markerilor de disfuncție ai celulelor valvulare aortice. Mediatorii inflamatori modificați în diabet au fost utilizați pentru generarea unei matrici de corelații împreună cu proteinele implicate în remodelarea și calcificarea valvei în diabet identificate, dar și cu parametrii plasmatici și funcționali asociați stării diabetice (Tucureanu, Filippi et al. 2019, Vadana, Cecoltan et al. 2020). Corelații semnificative au fost identificate între mediatorii inflamatori, osteogeni și de remodelare și parametrii plasmatici,

sugerând asociații moleculare specifice care pot contribui la disfuncția timpurie a valvei, detectată în modelul de șoarece diabetic hiperlipemic.

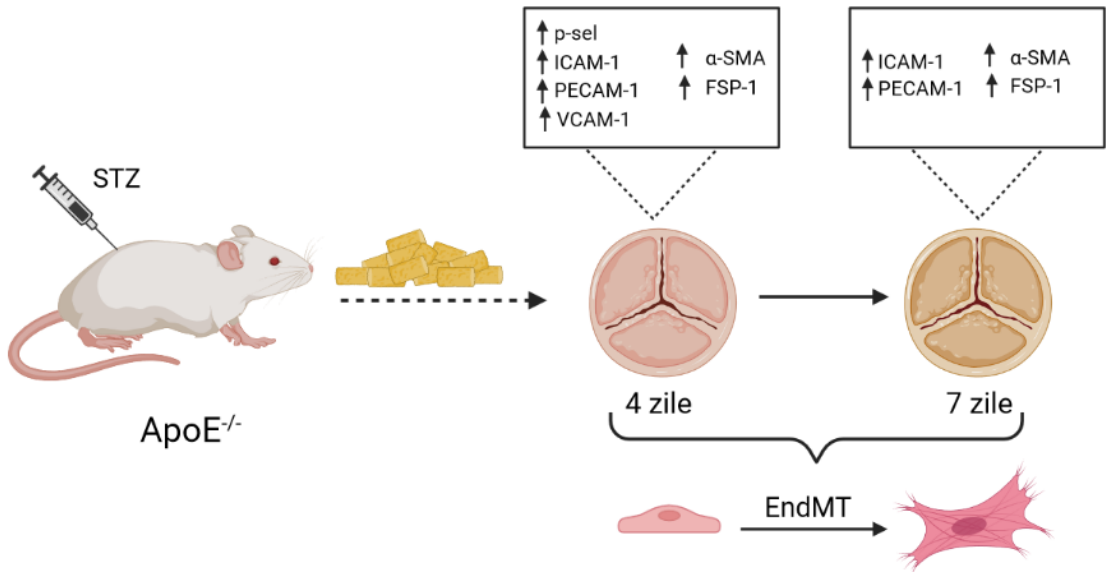


Figura 1. Schematizarea concluziilor studiului in vivo. *Șoarecii ApoE$^{-/-}$ injectați cu STZ și hrăniți cu dietă bogată în lipide prezintă supraexprimarea markerilor de activare a VEC (P-selectina, VCAM-1, ICAM-1si PECAM-1) și de activare a VIC (α-SMA și FSP-1) la 4 și 7 zile și celule implicate în EndMT.*

La nivelul valvelor provenite de la șoarecii diabetici au fost identificate prin imunohistochimie celule implicate în EndMT în zona leziunilor bogate în lipide, sugerând că diabetul este implicat în supraexprimarea markerilor de disfuncție ai celulelor valvulare aortice. Mediatorii inflamatori modificați în diabet au fost utilizați pentru generarea unei matrici de corelații împreună cu proteinele implicate în remodelarea și calcificarea valvei în diabet identificate, dar și cu parametrii plasmatici și funcționali asociați stării diabetice (Tucureanu, Filippi et al. 2019, Vadana, Cecoltan et al. 2020). Corelații semnificative au fost identificate între mediatorii inflamatori, osteogeni și de remodelare și parametrii plasmatici, sugerând asociații moleculare specifice care pot contribui la disfuncția timpurie a valvei, detectată în modelul de șoarece diabetic hiperlipemic.

Cercetarea din **Capitolul II** a vizat investigarea *in vitro* a mecanismelor implicate în inflamația celulelor valvulare în condiții de expunere cronică la concentrații crescute de glucoză, și a avut **trei obiective specifice**: (1) izolarea și caracterizarea de celule valvulare aortice umane primare (2) dezvoltarea de modele 3D *in vitro* populate cu celule valvulare

umane și (3) descrierea mecanismelor implicate în inflamația celulelor valvulare în condiții de expunere cronică la concentrații crescute de glucoză în modelele 3D dezvoltate.

Pentru îndeplinirea **obiectivului specific (1)**, celulele valvulare umane au fost izolate prin digestie enzimatică din valve aortice umane obținute de la Spitalul Militar Central (București) în urma operațiilor de înlocuire a valvei. Culturile pure de celule valvulare endoteliale si interstitiale primare au fost stabilite prin separarea cu sfere magnetice CD31+, iar markerii specifici VIC și VEC au fost puși în evidență prin imunohistochimie.

În cadrul **obiectivului (2)** au fost investigate mai multe variante de modele *in vitro*: cuspă porcină decelularizată repopulată cu celule umane (subcapitolul II.1.2.), model bioprintat pe bază de hidrogeluri comerciale (subcapitolul II.1.3.) și modele pe bază de hidrogeluri dezvoltate în cadrul laboratorului nostru din gelatină metacrilată (subcapitolul II.1.4.) și din rădăcină aortică porcină decelularizată (subcapitolul II.1.5.).

Modelul de cuspă porcină decelularizată și repopulată cu celule umane (subcapitolul II.1.2.) a presupus 2 etape: (1) decelularizarea țesutului nativ și (2) repopularea matricei obținute cu celule umane. Pentru prima etapă, decelularizarea a fost confirmată prin cuantificarea ADN-ului din matricea rezultată și colorații histologice pentru evidențierea celulelor și a proteinelor de MEC. Pentru a doua parte, au fost testate multiple tehnici pentru repopularea matricei cu celule umane. La exterior s-a reușit obținerea unui monostrat uniform de celule endoteliale, dar randamentul de repopulare a matricei la interior cu fibroblaste/VIC nu a fost suficient de ridicat pentru realizarea unui model *in vitro* pentru investigarea patologiei valvei aortice.

Dintre formulele de hidrogeluri comerciale testate pentru obținerea unui model bioprintat *in vitro* (subcapitolul II.1.3.), hidrogelurile pe bază de gelatină au prezentat compatibilitate cu celulele confirmată prin teste de viabilitate și microscopie. VIC încapsulate în hidrogelurile BioInk și Gel4Cell au prezentat viabilitate ridicată și au format o rețea tridimensională la interiorul construcților 3D. Pe de altă parte, VEC nu sunt compatibile cu tipul de cultură încapsulată, dar atunci când sunt cultivate deasupra hidrogelurilor pe bază de gelatină proliferează și formează monostrat caracteristic. Dintre cele 3 formule testate, hidrogelurile pe bază de gelatină care au prezentat cea mai ridicată biocompatibilitate, au fost și cel mai greu de bioprintat datorită proprietăților variabile și a instabilității în cultură la 37°C. Formula CellinkRGDa fost cea mai compatibilă cu protocolul de bioprintare, dar nu și cu cu celulele valvulare umane.

Plecând de la rezultatele promițătoare de biocompatibilitate cu celulele valvulare ale hidrogelurilor comerciale pe bază de gelatină și a informațiilor din literatura de specialitate,

în umătoarea parte a cercetării (subcapitolul II.1.4.) am dezvoltat în cadrul laboratorului nostru o formulă de hidrogel pe bază de gelatină metacrilată (GP-1). Rezultatele de biocompatibilitate și caracterizare fenotipică au arătat că hidrogelul GP-1 dezvoltat în laborator nu este citotoxic, permite proliferarea celulară, iar celulele valvulare încapsulate în hidrogel sau cultivate la suprafața lui își păstrează markerii caracteristici. De asemenea, exprimarea genică la nivel de ARNm determinată prin RT-PCR și proteică determinată prin Westrn Blot a α-SMA, marker de activare a VIC, scade atunci când celulele sunt cultivate în hidrogelul GP-1 față de cultura 2D clasică, replicând fenotipul VIC caracteristic valvei native. Exprimarea genică crescută la nivel de ARNm a α-SMA din prima săptămână este comparativă cu cea din cultura 2D, și se asociază cu exprimarea crescută a MMP-urilor și a unor elemente de MEC (colagen I, colagen III, elastină și laminină), sugerând un proces inițial de remodelare și adaptare a celulelor în noua matrice (Ciortan, Macarie et al. 2020).

Pentru obținerea unui model cu structură proteică mai apropiată de cea a MEC din VA nativă, am dezvoltat o a doua formulă de hidrogel din matrice extracelulară nativă porcină (HDRA). La fel ca și în cazul primelor studii, hidrogelul a fost evaluat din punct de vedere al compoziției proteice, prin colorații histologice și SDS-PAGE. Astfel, s-a arătat că principala componentă din HDRA este colagenuul de tip I și/sau III, asemănătoare stratului fibrosa din valvă. Analiza histologică a arătat că structura construcților pe bază de HDRA este foarte similară din punct de vedere al densității și porozității cu cea a țesutului valvular nativ decelularizat. Din analiza de biocompatibilitate cu celulele valvulare umane realizată prin imunohistochimie și determinarea viabilității, a rezultat că VEC formează un monostrat continuu la suprafața construcților HDRA, exprimă markerul endotelial CD31 și proliferează în cultură, iar VIC se distribuie uniform în interiorul hidrogelului unde formează o rețea complexă.

Pentru îndeplinirea **obiectivului (3)** modelele *in vitro* pe bază de hidrogel din gelatină metacrilată (GP-1) și hidrogel din rădăcină aortică porcină decelularizată (HDRA) dezvoltate în cadrul laboratorului nostru au fost utilizate pentru a investiga inflamația celulelor valvulare aortice umane în condiții de expunere la cronică la concentrații crescute de glucoză.

În **modelul *in vitro* bazat pe hidrogel GP-1** și populat cu celule valvulare umane în co-cultură, rezultatele de RT-PCR au arătat că, atunci când sunt expuse la concentrații crescute de glucoză (HG), VEC devin disfuncționale prin supraexprimarea la nivel de ARNm de citokine și chemokine cu efect pro-inflamator (MCP-1, TNF-α și IL-8 la 7 zile și MCP-1 și IL-1β la 14 zile de HG) și molecule de adeziune (VCAM-1 și E-selectină la 7 și

14 zile de HG). În contrast, expunerea la HG până la 14 zile nu modifică exprimarea α-SMA în VIC, sugerând că glucoza nu este implicată în tranziția VIC către un fenotip activat de tip miofibroblast. VIC răspund însă la concentrația crescută de glucoză prin asumarea unui fenotip inflamator, caracterizat prin creșterea exprimării de citokine și chemokine cu efect pro-inflamator, la 7 (IL-1β) și 14 zile (TNF-α, IL-8 și IL-1β) de expunere la HG. Activarea VEC are deci loc în principal în ziua 7 de expunere la HG, după care este posibil să se propage la VIC în ziua 14. Expresia proteică a mediatorilor inflamatori IL-1β și MCP-1 secretați în mediu de celulele valvulare cultivate în HG determinată prin ELISA crește semnificativ doar în ziua 14, confirmând astfel că inflamația celulelor valvulare este mai pronunțată la un timp experimental mai lung..

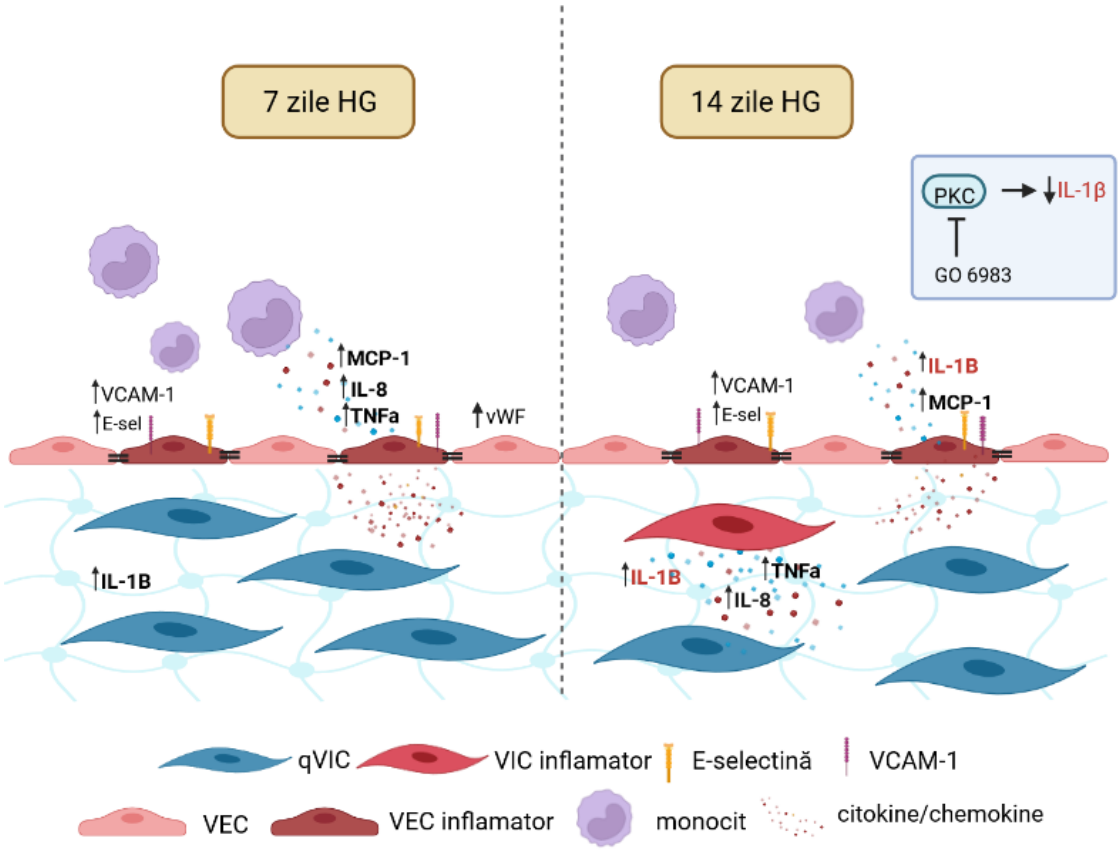


Figura 2. Schematizarea concluziilor studiului pe modelul in vitro GP-1*. Expunerea cronică la HG induce un răspuns inflamator secvențial al celulelor valvulare: la 7 zile răspunsul inflamator al VEC este cel dominant, și se caracterizează prin supraexprimarea vWF, MCP-1, IL-1β , VCAM-1 și E-selectină. La 14 zile VIC tranziționează către un fenotip inflamator puternic (supraxexprimarea IL-1β, TNF-α, IL-8), sugerând că inflamația cronică a VIC se poate datora în parte VEC, instalându-se deci mai târziu în timpul progresiei BVA;*

Un potențial mecanism implicat în exprimarea și eliberarea IL-1β în condiții de expunere cronică la concentrații crescute de glucoză este mediat de calea PKC.

La nivel molecular, utilizând modelul de co-cultură în hidrogel GP-1, am identificat un potențial mecanism de exprimare a IL-1β în condiții de expunere cronică la glucoză crescută, intermediat de pPKC. Astfel, am observat că exprimarea pPKC crește semnificativ în VEC la 7 zile și în VIC la 14 zile în condiții de HG, iar inhibarea ei reduce semnificativ concentrația de Il-1β secretat în mediu în condiții de HG. Astfel, rezultatele obținute în modelul GP-1 sugerează că, în condiții de HG, procesul inflamator la nivelul valvei este declanșat întâi de VEC, după care se propagă la VIC, unde inflamația se cronicizează și poate favoriza calcificarea valvei.

În **modelul *in vivo* bazat pe hidrogel HDRA** au fost investigate în principal modificările fenotipice ale VEC cu implicații în patologia valvulară. Rezultatele de exprimare genică și imunohistochimie au arătat că, atunci când construcții HDRA populați cu celule valvulare umane sunt expuși unor concentrații patologice de glucoză, are loc declanșarea EndMT, observată și in modelul *in vivo*, caracterizată prin supraexprimarea markerilor mezenchimali (α-SMA și vimentină), scăderea exprimării markerilor endoteliali (CD31 și VE-caderină) și creșterea co-localizării α-SMA și CD31 în celulele valvulare. Se poate concluziona astfel că o concentrație patologică de glucoză, similară celei din diabet, favorizează EndMT, posibil prin crearea unui mediu pro-inflamator în valvă, așa cum am arătat că se întâmplă în construcții GP-1. Anterior, Mahler și colab. (2013) au demonstrat că citokinele inflamatorii (TNFα și IL-6) induc EndMT în celulele endoteliale valvulare ovine, proces prin care sunt generate miofibroblaste implicate în remodelarea patologică a valvei (Mahler, Farrar et al. 2013).

O altă moleculă a cărei exprimare crescută se asociază cu disfuncția VEC și care a fost identificată drept agent proinflamator în diabetul timpuriu este ET-1 (Iglarz and Clozel 2007, Saleh, Boesen et al. 2011). Importanța ET-1 în diabet a fost evidențiată prin studii care au arătat că HG crește exprimarea ET-1 în celulele primare și liniile de celule endoteliale aortice și că dereglarea sistemului ET-1 joacă un rol important în instalarea și progresia patologiei macro- și microvasculaturii în diabet (Pernow, Shemyakin et al. 2012, Manea, Todirita et al. 2013). A fost arătat că ET-1 și receptorii săi sunt supraexprimați în stenoza aortică, sugerând că o serie de modificări patologice asociate leziunilor aterosclerotice și calcificării valvei pot fi o consecință a semnalizării ET-1(Peltonen, Taskinen et al. 2009). Din aceste motive, am investigat efectul HG asupra exprimării ET-1 în VEC cultivate în

HDRA. Rezultatele de RT-PCR au arătat că exprimarea ET-1 și a receptorilor săi (ET-A și ET-B) este crescută în VEC din construcții HDRA expuși 7 zile la HG față de martorul de glucoză normală (NG). În plus, rezultatele ELISA arată că nivelul de IL-1β și MCP-1 din mediul de cultură al construcților expuși la HG este redus semnificativ atunci când construcții sunt expuși la HG în prezența de antagoniști ai receptorilor ET-1. Antagonistul receptorului de tip B reduce secreția de citokine și chemokine pro-inflamatorii aproape de nivelul observant la martorul NG, demonstrând astfel implicarea semnalizării ET-1 în inflamația VEC initiată de HG. Deoarece se cunoaște că IL-1β este implicată în tranziția fenotipică a celulelor endoteliale vasculare din cadrul EndMT, se poate presupune că IL-1β ar putea fi implicat în EndMT în celulele endoteliale valvulare. A fost demonstrat anterior că atât ET-1 cât și IL-1β sunt implicate în inducerea EndMT în celulele endoteliale din alte paturi vasculare (Chaudhuri, Zhou et al. 2007, Widyantoro, Emoto et al. 2010). Rolul ET-1 în EndMT a fost studiat *in vivo* în șoareci diabetici deficienți pentru gena care codifică proteina ET-1, unde s-a arătat că ET-1 promovează dezvoltarea fibrozei cardiace (Cho, Lee et al. 2018).

Expunerea VEC cultivate pe HDRA la glucoză crescută a dus de asemenea la supraexprimarea moleculelor de adeziune ICAM-1 și VCAM-1 implicate în recrutarea de monocite în spațiul subendotelial.

Datele obținute pe modelul HDRA sugerează că glucoza crescută promovează EndMT a VEC, posibil prin semnalizarea ET-1 și secreția de IL-1β. De asemenea, mediul inflamator creat poate contribui la creșterea aderenței endoteliului pentru celule imune și și propagarea inflamației în valvă.

Studiile prezentate în cadrul tezei referitoare la procesul inflamator în condiții de diabet, împreună cu cele realizate în cadrul grupului nostru de cercetare (Tucureanu, Filippi et al. 2019) referitoare la markerii de calcificare, au arătat că procesul inflamator și tranziția osteogenică a celulelor interstitiale valvulare au loc concomitent în diabetul timpuriu, cu implicații asupra disfuncției valvei. Până în prezent, efectelul hiperglicemiei asupra celulelor valvulare umane cultivate în modele 3D *in vitro* nu a fost investigat de niciun alt grup, astfel că rezultatele obținute în această cercetare sunt originale.

Obținerea acestor rezultate a fost posibila prin utilizarea tehnicilor de lucru cu animale pentru stabilirea modelului *in vivo,* decelularizarea țesuturilor și dezvoltarea de hidrogeluri pentru obținerea modelelor *in vitro*, utilizarea tehnicilor de biologie moleculară, imunohistochimie sau adeziune în flux, ceea ce subliniază caracterul interdisciplinar și complexitatea cercetării prezentate.

Una dintre limitările acestei cercetări constă din utilizarea unui model murin de diabet, care nu replică foarte exact patologia umană. Deși există avantaje experimentale certe și se pot obține date importante despre patofiziogia diabetului, se cunoaște că diabetul dezvoltat în modelele animale nu este echivalent cu diabetul uman, astfel că este necesară precauție în interpretarea rezultatelor și extrapolarea lor la patologia umană. În cazul modelelor *in vitro*, o limitare constă din lipsa caracterizării hidrogelurilor dezvoltate în cadrul laboratorului nostru din punct de vedere al proprietăților fizice relevante pentru cultura de celule *in vitro* (rigiditate, viteză de degradare, vâscozitate), datorată lipsei unei infrastructuri adecvate pentru o astfel de analiză. Din acest motiv, în vederea îmbunătățirii formulelor de hidrogel GP-1 și HDRA pentru extinderea studiilor prezentate în această cercetare, îmi propun să colaborez pe viitor cu o unitate de cercetare care să realizeze astfel de analize.

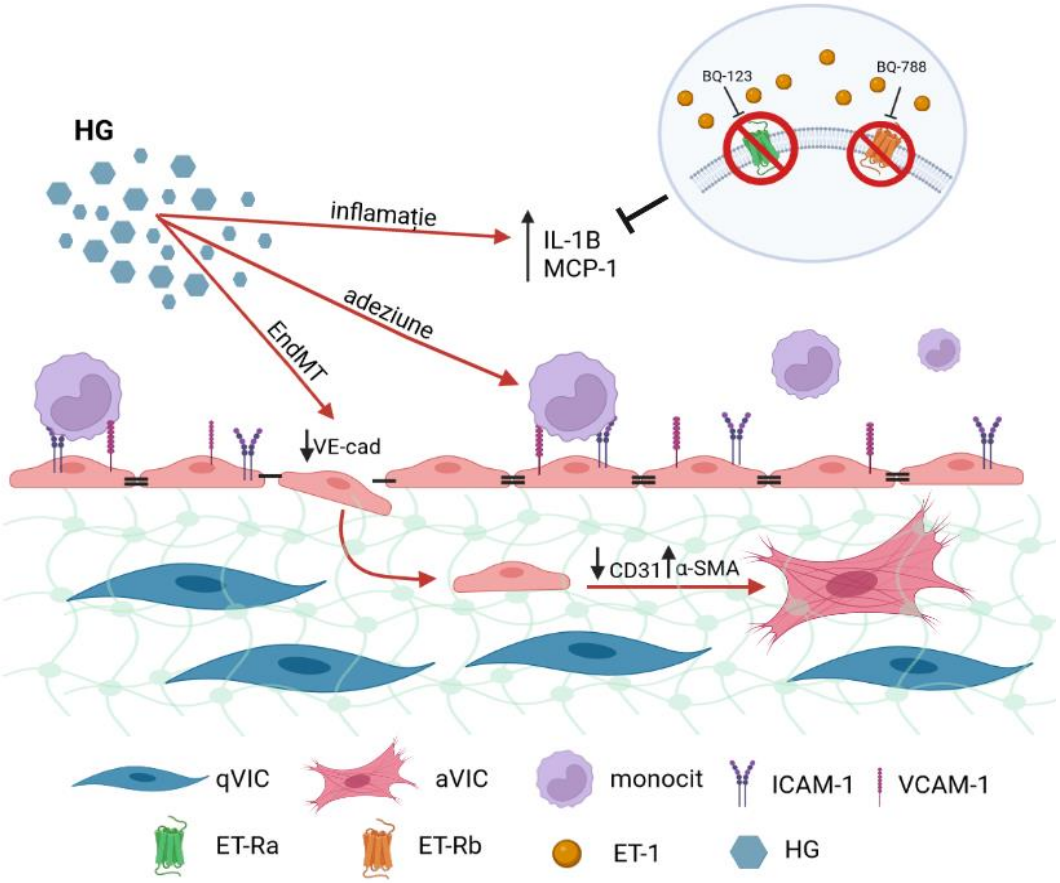


Figura 3. Schematizarea concluziilor studiului pe modelul in vitro HDRA. *Expunerea cronică la oncentrație crescută de glucoză favorizează (1) inițierea procesului de EndMT, caracterizată prin scăderea exprimării markerilor endoteliali (CD31 și VE-caderină), supraexprimarea markerilor mezenchimali (α-SMA și vimentină) și creșterea co-localizării*

α-SMA și CD31 în celulele valvulare; (2) recrutarea monocitelor prin supraexprimarea moleculelor de adeziune VCAM-1 și ICAM-1 la niveleul VEC și (3) exprimarea și eliberarea de citokine și chemokine pro-inflamatorii IL-1β și MCP-1, prin mecanisme mediate în parte de ET-1 și receptorii săi ET-Ra și ET-Rb.

Complexitatea și dezvoltarea lentă a BVA în timp pot fi considerate o oportunitate în ceea ce privește posibilitatea de a planifica intervenții terapeutice înainte ca intervenția chirurgicală să devină inevitabilă. Astfel, identificarea principalelor molecule asociate procesului inflamator indus de diabet celulelor valvulare și descrise în acest studiu are ca perspective în primul rând definirea unor abordări terapeutice țintite, specifice, care în prezent nu sunt disponibile. De altfel, molecula de adeziune VCAM-1, găsită ca fiind supraexprimată de endoteliul valvular în studiile din teza de față, a fost deja utilizată cu succes drept țintă pentru oprirea tranziției osteogene a VIC. Astfel, țintirea cu Runx2-shRNA *in vitro* a redus nivelul de Runx2, OSP, BSP, BMP-2 (Voicu, Rebleanu et al. 2022), iar rezultatele preliminare *in vivo* sunt promițătoare. Mai mult, hidrogelurile și modelele 3D dezvoltate în acest studiu pot reprezenta un punct de plecare pentru dezvoltarea unui model bio-printat de foiță valvulară populată cu celule umane, care să reprezinte o platformă de testare a terapiilor farmacologice pentru tratamentul BVA.

Bibliografie

1. Aronow, W. S., C. Ahn, I. Kronzon and M. E. Goldman (2001). "Association of coronary risk factors and use of statins with progression of mild valvular aortic stenosis in older persons." Am J Cardiol **88**(6): 693-695.
2. Bogdanova, M., A. Zabirnyk, A. Malashicheva, K. Z. Enayati, T. A. Karlsen, M. L. Kaljusto, J. P. Kvitting, E. Dissen, G. J. Sullivan, A. Kostareva, K. O. Stenslokken, A. Rutkovskiy and J. Vaage (2019). "Interstitial cells in calcified aortic valves have reduced differentiation potential and stem cell-like properties." Sci Rep **9**(1): 12934.
3. Bogdanova, M., A. Zabirnyk, A. Malashicheva, D. Semenova, J. E. Kvitting, M. L. Kaljusto, M. D. M. Perez, A. Kostareva, K. O. Stenslokken, G. J. Sullivan, A. Rutkovskiy and J. Vaage (2022). "Models and Techniques to Study Aortic Valve Calcification in Vitro, ex Vivo and in Vivo. An Overview." Front Pharmacol **13**: 835825.
4. Bowler, M. A. and W. D. Merryman (2015). "In vitro models of aortic valve calcification: solidifying a system." Cardiovasc Pathol **24**(1): 1-10.
5. Butcher, J. T. and R. M. Nerem (2006). "Valvular endothelial cells regulate the phenotype of interstitial cells in co-culture: effects of steady shear stress." Tissue Eng **12**(4): 905-915.
6. Chaudhuri, V., L. Zhou and M. Karasek (2007). "Inflammatory cytokines induce the transformation of human dermal microvascular endothelial cells into myofibroblasts: a potential role in skin fibrogenesis." J Cutan Pathol **34**(2): 146-153.
7. Chen, J. H., C. Y. Yip, E. D. Sone and C. A. Simmons (2009). "Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential." Am J Pathol **174**(3): 1109-1119.
8. Chen, M. B., S. Srigunapalan, A. R. Wheeler and C. A. Simmons (2013). "A 3D microfluidic platform incorporating methacrylated gelatin hydrogels to study physiological cardiovascular cell-cell interactions." Lab Chip **13**(13): 2591-2598.
9. Cho, J. G., A. Lee, W. Chang, M. S. Lee and J. Kim (2018). "Endothelial to Mesenchymal Transition Represents a Key Link in the Interaction between Inflammation and Endothelial Dysfunction." Front Immunol **9**: 294.
10. Ciortan, L., R. D. Macarie, S. Cecoltan, M. Vadana, M. M. Tucureanu, A. C. Mihaila, I. Droc, E. Butoi and I. Manduteanu (2020). "Chronic High Glucose Concentration

Induces Inflammatory and Remodeling Changes in Valvular Endothelial Cells and Valvular Interstitial Cells in a Gelatin Methacrylate 3D Model of the Human Aortic Valve." Polymers (Basel) **12**(12).

11. Coffey, S., R. Roberts-Thomson, A. Brown, J. Carapetis, M. Chen, M. Enriquez-Sarano, L. Zuhlke and B. D. Prendergast (2021). "Global epidemiology of valvular heart disease." Nat Rev Cardiol **18**(12): 853-864.
12. Cowell, S. J., D. E. Newby, R. J. Prescott, P. Bloomfield, J. Reid, D. B. Northridge, N. A. Boon, S. Scottish Aortic and I. o. R. I. Lipid Lowering Trial (2005). "A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis." N Engl J Med **352**(23): 2389-2397.
13. Cushing, M. C., P. D. Mariner, J. T. Liao, E. A. Sims and K. S. Anseth (2008). "Fibroblast growth factor represses Smad-mediated myofibroblast activation in aortic valvular interstitial cells." FASEB J **22**(6): 1769-1777.
14. Di Vito, A., A. Donato, I. Presta, T. Mancuso, F. S. Brunetti, P. Mastroroberto, A. Amorosi, N. Malara and G. Donato (2021). "Extracellular Matrix in Calcific Aortic Valve Disease: Architecture, Dynamic and Perspectives." Int J Mol Sci **22**(2).
15. Dludla, P. V., E. Joubert, C. J. F. Muller, J. Louw and R. Johnson (2017). "Hyperglycemia-induced oxidative stress and heart disease-cardioprotective effects of rooibos flavonoids and phenylpyruvic acid-2-O-beta-D-glucoside." Nutr Metab (Lond) **14**: 45.
16. Dongway, A. C., A. S. Faggad, H. Y. Zaki and B. E. Abdalla (2015). "C-reactive protein is associated with low-density lipoprotein cholesterol and obesity in type 2 diabetic Sudanese." Diabetes Metab Syndr Obes **8**: 427-435.
17. Filip, D. A., A. Nistor, A. Bulla, A. Radu, F. Lupu and M. Simionescu (1987). "Cellular events in the development of valvular atherosclerotic lesions induced by experimental hypercholesterolemia." Atherosclerosis **67**(2-3): 199-214.
18. Geckil, H., F. Xu, X. Zhang, S. Moon and U. Demirci (2010). "Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics." Nanomedicine (Lond) **5**(3): 469-484.
19. Goody, P. R., M. R. Hosen, D. Christmann, S. T. Niepmann, A. Zietzer, M. Adam, F. Bonner, S. Zimmer, G. Nickenig and F. Jansen (2020). "Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets." Arterioscler Thromb Vasc Biol **40**(4): 885-900.

20. Gould, S. T., E. E. Matherly, J. N. Smith, D. D. Heistad and K. S. Anseth (2014). "The role of valvular endothelial cell paracrine signaling and matrix elasticity on valvular interstitial cell activation." Biomaterials **35**(11): 3596-3606.
21. Hajdu, Z., S. J. Romeo, P. A. Fleming, R. R. Markwald, R. P. Visconti and C. J. Drake (2011). "Recruitment of bone marrow-derived valve interstitial cells is a normal homeostatic process." J Mol Cell Cardiol **51**(6): 955-965.
22. Han, K., D. Shi, L. Yang, M. Xie, R. Zhong, Z. Wang, F. Gao, X. Ma and Y. Zhou (2021). "Diabetes Is Associated With Rapid Progression of Aortic Stenosis: A Single-Center Retrospective Cohort Study." Front Cardiovasc Med **8**: 812692.
23. Hinton, R. B., Jr., J. Lincoln, G. H. Deutsch, H. Osinska, P. B. Manning, D. W. Benson and K. E. Yutzey (2006). "Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves." Circ Res **98**(11): 1431-1438.
24. Hjortnaes, J., C. Goettsch, J. D. Hutcheson, G. Camci-Unal, L. Lax, K. Scherer, S. Body, F. J. Schoen, J. Kluin, A. Khademhosseini and E. Aikawa (2016). "Simulation of early calcific aortic valve disease in a 3D platform: A role for myofibroblast differentiation." J Mol Cell Cardiol **94**: 13-20.
25. Hong, S., J. S. Kim, B. Jung, C. Won and C. Hwang (2019). "Coaxial bioprinting of cell-laden vascular constructs using a gelatin-tyramine bioink." Biomater Sci **7**(11): 4578-4587.
26. Huang, X., N. Yang, V. F. Fiore, T. H. Barker, Y. Sun, S. W. Morris, Q. Ding, V. J. Thannickal and Y. Zhou (2012). "Matrix stiffness-induced myofibroblast differentiation is mediated by intrinsic mechanotransduction." Am J Respir Cell Mol Biol **47**(3): 340-348.
27. Hulin, A., L. J. Anstine, A. J. Kim, S. J. Potter, T. DeFalco, J. Lincoln and K. E. Yutzey (2018). "Macrophage Transitions in Heart Valve Development and Myxomatous Valve Disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **38**(3): 636-644.
28. Hulin, A., A. Hego, P. Lancellotti and C. Oury (2018). "Advances in Pathophysiology of Calcific Aortic Valve Disease Propose Novel Molecular Therapeutic Targets." Front Cardiovasc Med **5**: 21.
29. Hulin, A., L. Hortells, M. V. Gomez-Stallons, A. O'Donnell, K. Chetal, M. Adam, P. Lancellotti, C. Oury, S. S. Potter, N. Salomonis and K. E. Yutzey (2019). "Maturation of heart valve cell populations during postnatal remodeling." Development **146**(12).

30. Hutson, H. N., T. Marohl, M. Anderson, K. Eliceiri, P. Campagnola and K. S. Masters (2016). "Calcific Aortic Valve Disease Is Associated with Layer-Specific Alterations in Collagen Architecture." PLoS One **11**(9): e0163858.
31. Iglarz, M. and M. Clozel (2007). "Mechanisms of ET-1-induced endothelial dysfunction." J Cardiovasc Pharmacol **50**(6): 621-628.
32. Jung, J. J., A. A. Ahmad, S. Rajendran, L. Wei, J. Zhang, J. Toczek, L. Nie, G. Kukreja, M. Salarian, K. Gona, M. Ghim, R. Chakraborty, K. A. Martin, G. Tellides, D. Heistad and M. M. Sadeghi (2022). "Differential BMP Signaling Mediates the Interplay Between Genetics and Leaflet Numbers in Aortic Valve Calcification." JACC Basic Transl Sci **7**(4): 333-345.
33. Kaushik, G., M. P. Ponnusamy and S. K. Batra (2018). "Concise Review: Current Status of Three-Dimensional Organoids as Preclinical Models." Stem Cells **36**(9): 1329-1340.
34. Keane, K. N., E. K. Calton, R. Carlessi, P. H. Hart and P. Newsholme (2017). "The bioenergetics of inflammation: insights into obesity and type 2 diabetes." Eur J Clin Nutr **71**(7): 904-912.
35. Kennedy, J. A., X. Hua, K. Mishra, G. A. Murphy, A. C. Rosenkranz and J. D. Horowitz (2009). "Inhibition of calcifying nodule formation in cultured porcine aortic valve cells by nitric oxide donors." Eur J Pharmacol **602**(1): 28-35.
36. Kodali, S. K., P. Velagapudi, R. T. Hahn, D. Abbott and M. B. Leon (2018). "Valvular Heart Disease in Patients >/=80 Years of Age." J Am Coll Cardiol **71**(18): 2058-2072.
37. Kopytek, M., P. Mazur, M. Zabczyk, A. Undas and J. Natorska (2021). "Diabetes concomitant to aortic stenosis is associated with increased expression of NF-kappaB and more pronounced valve calcification." Diabetologia **64**(11): 2562-2574.
38. Kruithof, B. P. T., V. van de Pol, T. Los, K. Lodder, B. M. Gourabi, M. C. DeRuiter, M. J. Goumans and N. Ajmone Marsan (2021). "New calcification model for intact murine aortic valves." J Mol Cell Cardiol **156**: 95-104.
39. Le Quang, K., R. Bouchareb, D. Lachance, M. A. Laplante, D. El Husseini, M. C. Boulanger, D. Fournier, X. P. Fang, R. K. Avramoglu, P. Pibarot, Y. Deshaies, G. Sweeney, P. Mathieu and A. Marette (2014). "Early development of calcific aortic valve disease and left ventricular hypertrophy in a mouse model of combined dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus." Arterioscler Thromb Vasc Biol **34**(10): 2283-2291.

40. Li, G., W. Qiao, W. Zhang, F. Li, J. Shi and N. Dong (2017). "The shift of macrophages toward M1 phenotype promotes aortic valvular calcification." J Thorac Cardiovasc Surg **153**(6): 1318-1327 e1311.
41. Lindman, B. R., R. O. Bonow and C. M. Otto (2013). "Current management of calcific aortic stenosis." Circ Res **113**(2): 223-237.
42. Liu, A. C. and A. I. Gotlieb (2008). "Transforming growth factor-beta regulates in vitro heart valve repair by activated valve interstitial cells." Am J Pathol **173**(5): 1275-1285.
43. Ma, H., A. R. Killaars, F. W. DelRio, C. Yang and K. S. Anseth (2017). "Myofibroblastic activation of valvular interstitial cells is modulated by spatial variations in matrix elasticity and its organization." Biomaterials **131**: 131-144.
44. Ma, J., G. Sanchez-Duffhues, M. J. Goumans and P. Ten Dijke (2020). "TGF-beta-Induced Endothelial to Mesenchymal Transition in Disease and Tissue Engineering." Front Cell Dev Biol **8**: 260.
45. Ma, X., D. Zhao, P. Yuan, J. Li, Y. Yun, Y. Cui, T. Zhang, J. Ma, L. Sun, H. Ma, Y. Zhang, H. Zhang, W. Zhang, J. Huang, C. Zou and Z. Wang (2020). "Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Calcific Aortic Valve Disease." Acta Cardiol Sin **36**(3): 183-194.
46. Mahler, G. J., E. J. Farrar and J. T. Butcher (2013). "Inflammatory cytokines promote mesenchymal transformation in embryonic and adult valve endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(1): 121-130.
47. Majumdar, U., S. Manivannan, M. Basu, Y. Ueyama, M. C. Blaser, E. Cameron, M. R. McDermott, J. Lincoln, S. E. Cole, S. Wood, E. Aikawa, B. Lilly and V. Garg (2021). "Nitric oxide prevents aortic valve calcification by S-nitrosylation of USP9X to activate NOTCH signaling." Sci Adv **7**(6).
48. Manduteanu, I., D. Simionescu, A. Simionescu and M. Simionescu (2021). "Aortic valve disease in diabetes: Molecular mechanisms and novel therapies." J Cell Mol Med **25**(20): 9483-9495.
49. Manduteanu, I., M. Voinea, G. Serban and M. Simionescu (1999). "High glucose induces enhanced monocyte adhesion to valvular endothelial cells via a mechanism involving ICAM-1, VCAM-1 and CD18." Endothelium **6**(4): 315-324.
50. Manea, S. A., A. Todirita and A. Manea (2013). "High glucose-induced increased expression of endothelin-1 in human endothelial cells is mediated by activated CCAAT/enhancer-binding proteins." PLoS One **8**(12): e84170.

51. Meza, C. A., J. D. La Favor, D.-H. Kim and R. C. Hickner (2019). "Endothelial Dysfunction: Is There a Hyperglycemia-Induced Imbalance of NOX and NOS?" International Journal of Molecular Sciences **20**(15): 3775.
52. Nandy, D., R. Janardhanan, D. Mukhopadhyay and A. Basu (2011). "Effect of hyperglycemia on human monocyte activation." J Investig Med **59**(4): 661-667.
53. Natorska, J. (2021). "Diabetes mellitus as a risk factor for aortic stenosis: from new mechanisms to clinical implications." Kardiol Pol **79**(10): 1060-1067.
54. Nehrenheim, L., S. Raschke, A. Stefanski, M. Barth, J. Isabel Selig, A. Barbian, A. Fernandez-Colino, K. Stuhler, P. Mela, A. Albert, A. Lichtenberg and P. Akhyari (2019). "Native aortic valve derived extracellular matrix hydrogel for three dimensional culture analyses with improved biomimetic properties." Biomed Mater **14**(3): 035014.
55. Nkomo, V. T., J. M. Gardin, T. N. Skelton, J. S. Gottdiener, C. G. Scott and M. Enriquez-Sarano (2006). "Burden of valvular heart diseases: a population-based study." Lancet **368**(9540): 1005-1011.
56. Nordquist, E., S. LaHaye, C. Nagel and J. Lincoln (2018). "Postnatal and Adult Aortic Heart Valves Have Distinctive Transcriptional Profiles Associated With Valve Tissue Growth and Maintenance Respectively." Front Cardiovasc Med **5**: 30.
57. O'Donnell, A. and K. E. Yutzey (2020). "Mechanisms of heart valve development and disease." Development **147**(13).
58. Padilla, J., A. J. Carpenter, N. A. Das, H. K. Kandikattu, S. Lopez-Ongil, L. A. Martinez-Lemus, U. Siebenlist, V. G. DeMarco and B. Chandrasekar (2018). "TRAF3IP2 mediates high glucose-induced endothelin-1 production as well as endothelin-1-induced inflammation in endothelial cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **314**(1): H52-H64.
59. Peltonen, T., P. Taskinen, J. Napankangas, H. Leskinen, P. Ohtonen, Y. Soini, T. Juvonen, J. Satta, O. Vuolteenaho and H. Ruskoaho (2009). "Increase in tissue endothelin-1 and ETA receptor levels in human aortic valve stenosis." Eur Heart J **30**(2): 242-249.
60. Pernow, J., A. Shemyakin and F. Bohm (2012). "New perspectives on endothelin-1 in atherosclerosis and diabetes mellitus." Life Sci **91**(13-14): 507-516.
61. Porras, A. M., N. C. van Engeland, E. Marchbanks, A. McCormack, C. V. Bouten, M. H. Yacoub, N. Latif and K. S. Masters (2017). "Robust Generation of Quiescent Porcine Valvular Interstitial Cell Cultures." J Am Heart Assoc **6**(3).

62. Porras, A. M., J. A. Westlund, A. D. Evans and K. S. Masters (2018). "Creation of disease-inspired biomaterial environments to mimic pathological events in early calcific aortic valve disease." Proc Natl Acad Sci U S A **115**(3): E363-E371.
63. Puperi, D. S., A. Kishan, Z. E. Punske, Y. Wu, E. Cosgriff-Hernandez, J. L. West and K. J. Grande-Allen (2016). "Electrospun Polyurethane and Hydrogel Composite Scaffolds as Biomechanical Mimics for Aortic Valve Tissue Engineering." ACS Biomater Sci Eng **2**(9): 1546-1558.
64. Rajamannan, N. M., F. J. Evans, E. Aikawa, K. J. Grande-Allen, L. L. Demer, D. D. Heistad, C. A. Simmons, K. S. Masters, P. Mathieu, K. D. O'Brien, F. J. Schoen, D. A. Towler, A. P. Yoganathan and C. M. Otto (2011). "Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update." Circulation **124**(16): 1783-1791.
65. Richards, J., I. El-Hamamsy, S. Chen, Z. Sarang, P. Sarathchandra, M. H. Yacoub, A. H. Chester and J. T. Butcher (2013). "Side-specific endothelial-dependent regulation of aortic valve calcification: interplay of hemodynamics and nitric oxide signaling." Am J Pathol **182**(5): 1922-1931.
66. Rodriguez, K. J. and K. S. Masters (2009). "Regulation of valvular interstitial cell calcification by components of the extracellular matrix." J Biomed Mater Res A **90**(4): 1043-1053.
67. Rutkovskiy, A., A. Malashicheva, G. Sullivan, M. Bogdanova, A. Kostareva, K. O. Stenslokken, A. Fiane and J. Vaage (2017). "Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification." J Am Heart Assoc **6**(9).
68. Saleh, M. A., E. I. Boesen, J. S. Pollock, V. J. Savin and D. M. Pollock (2011). "Endothelin receptor A-specific stimulation of glomerular inflammation and injury in a streptozotocin-induced rat model of diabetes." Diabetologia **54**(4): 979-988.
69. Santa-Cruz Mateos, C., A. Valencia-Exposito, I. M. Palacios and M. D. Martin-Bermudo (2020). "Integrins regulate epithelial cell shape by controlling the architecture and mechanical properties of basal actomyosin networks." PLoS Genet **16**(6): e1008717.
70. Scatena, M., M. F. Jackson, M. Y. Speer, E. M. Leaf, M. C. Wallingford and C. M. Giachelli (2018). "Increased Calcific Aortic Valve Disease in response to a

diabetogenic, procalcific diet in the LDLr(-/-)ApoB(100/100) mouse model." Cardiovasc Pathol **34**: 28-37.

71. Scott, A. J., L. R. Simon, H. N. Hutson, A. M. Porras and K. S. Masters (2021). "Engineering the aortic valve extracellular matrix through stages of development, aging, and disease." J Mol Cell Cardiol **161**: 1-8.
72. Sider, K. L., M. C. Blaser and C. A. Simmons (2011). "Animal models of calcific aortic valve disease." Int J Inflam **2011**: 364310.
73. Simionescu, M., D. Popov, A. Sima, M. Hasu, G. Costache, S. Faitar, A. Vulpanovici, C. Stancu, D. Stern and N. Simionescu (1996). "Pathobiochemistry of combined diabetes and atherosclerosis studied on a novel animal model. The hyperlipemic-hyperglycemic hamster." Am J Pathol **148**(3): 997-1014.
74. Simmons, C. A., G. R. Grant, E. Manduchi and P. F. Davies (2005). "Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes correlates with side-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves." Circ Res **96**(7): 792-799.
75. Tucureanu, M. M., A. Filippi, N. Alexandru, C. Ana Constantinescu, L. Ciortan, R. Macarie, M. Vadana, G. Voicu, S. Frunza, D. Nistor, A. Simionescu, D. T. Simionescu, A. Georgescu and I. Manduteanu (2019). "Diabetes-induced early molecular and functional changes in aortic heart valves in a murine model of atherosclerosis." Diab Vasc Dis Res **16**(6): 562-576.
76. Vadana, M., S. Cecoltan, L. Ciortan, R. D. Macarie, M. M. Tucureanu, A. C. Mihaila, I. Droc, E. Butoi and I. Manduteanu (2020). "Molecular mechanisms involved in high glucose-induced valve calcification in a 3D valve model with human valvular cells." J Cell Mol Med **24**(11): 6350-6361.
77. Voicu, G., D. Rebleanu, C. A. Mocanu, G. Tanko, I. Droc, C. M. Uritu, M. Pinteala, I. Manduteanu, M. Simionescu and M. Calin (2022). "VCAM-1 Targeted Lipopolyplexes as Vehicles for Efficient Delivery of shRNA-Runx2 to Osteoblast-Differentiated Valvular Interstitial Cells; Implications in Calcific Valve Disease Treatment." Int J Mol Sci **23**(7).
78. Wang, M., Y. Liu, Y. Liang, K. Naruse and K. Takahashi (2021). "Systematic Understanding of Pathophysiological Mechanisms of Oxidative Stress-Related Conditions-Diabetes Mellitus, Cardiovascular Diseases, and Ischemia-Reperfusion Injury." Front Cardiovasc Med **8**: 649785.
79. Widyantoro, B., N. Emoto, K. Nakayama, D. W. Anggrahini, S. Adiarto, N. Iwasa, K. Yagi, K. Miyagawa, Y. Rikitake, T. Suzuki, Y. Y. Kisanuki, M. Yanagisawa and

K. Hirata (2010). "Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal transition." Circulation **121**(22): 2407-2418.

80. Yadgir, S., C. O. Johnson, V. Aboyans, O. M. Adebayo, R. A. Adedoyin, M. Afarideh, F. Alahdab, A. Alashi, V. Alipour, J. Arabloo, S. Azari, C. M. Barthelemy, C. P. Benziger, A. E. Berman, A. Bijani, J. J. Carrero, F. Carvalho, A. Daryani, A. R. Duraes, A. Esteghamati, T. A. Farid, F. Farzadfar, E. Fernandes, I. Filip, M. M. Gad, S. Hamidi, S. I. Hay, O. S. Ilesanmi, S. S. Naghibi Irvani, M. Jurisson, A. Kasaeian, A. P. Kengne, A. R. Khan, A. Kisa, S. Kisa, D. Kolte, N. Manafi, A. Manafi, G. A. Mensah, E. M. Mirrakhimov, Y. Mohammad, A. H. Mokdad, R. I. Negoi, H. L. Thi Nguyen, T. H. Nguyen, M. R. Nixon, C. M. Otto, S. Patel, T. Pilgrim, A. Radfar, D. L. Rawaf, S. Rawaf, W. F. Rawasia, A. Rezapour, L. Roever, A. M. Saad, S. Saadatagah, S. Senthilkumaran, K. Sliwa, B. E. Tesfay, B. X. Tran, I. Ullah, M. Vaduganathan, T. J. Vasankari, C. D. A. Wolfe, N. Yonemoto, G. A. Roth and C. Global Burden of Disease Study Nonrheumatic Valve Disease (2020). "Global, Regional, and National Burden of Calcific Aortic Valve and Degenerative Mitral Valve Diseases, 1990-2017." Circulation **141**(21): 1670-1680.
81. Yan, A. T., M. Koh, K. K. Chan, H. Guo, D. A. Alter, P. C. Austin, J. V. Tu, H. C. Wijeysundera and D. T. Ko (2017). "Association Between Cardiovascular Risk Factors and Aortic Stenosis: The CANHEART Aortic Stenosis Study." J Am Coll Cardiol **69**(12): 1523-1532.
82. Yip, C. Y., J. H. Chen, R. Zhao and C. A. Simmons (2009). "Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(6): 936-942.
83. Zabirnyk, A., M. D. M. Perez, M. Blasco, K. O. Stenslokken, M. D. Ferrer, C. Salcedo and J. Vaage (2020). "A Novel Ex Vivo Model of Aortic Valve Calcification. A Preliminary Report." Front Pharmacol **11**: 568764.

ROMANIAN ACADEMY

INSTITUTE OF CELLULAR BIOLOGY AND PATHOLOGY

„NICOLAE SIMIONESCU”

THESIS

SUMMARY

LIPID RAFT PROTEOMICS AND SIGNALING MOLECULAR MECHANISMS IN HYPERLIPIDEMIC EXPERIMENTAL MODELS

PhD Coordinator

PhDAntohe Felicia

PhD Student

SuicaViorel-Iulian

Bucharest

2014

Content:

INTRODUCTION *10*

FIRST PART – ACTUAL STATE OF KNOWLEDGE REGARDING LIPID RAFTS AND SIGNALING MOLECULAR MECHANISMS *11*

I.1. Introductory notions *11*

I.2. The cell membrane as a basis for the organization of membrane microdomains *14*

I.2.1 Lipids as part of cell membranes and membrane microdomains *14*

I.2.2 Lipid bilayer and membrane asymmetry *16*

I.2.3 Sterols and cholesterol - major constituents of membrane microdomains *19*

I.3. The concept of lipid rafts (membrane microdomains) *21*

I.4. The dynamics of plasma membrane molecules and membrane microdomains *36*

I.4.1 Biochemical and biophysical methods to investigate the dynamics of lipid rafts *38*

I.4.2 Lipid rafts stability generated by the relationship between the size and life time *41*

I.4.3 Modeling and destabilizing lipid rafts *45*

I.5. Dynamic functionality of lipid rafts determined by external, membrane and cytosolicfactors *49*

I.5.1 External factors that control the dynamics of lipid rafts *50*

I.5.2 Lipid rafts dynamics control at the plasma membrane level *52*

I.5.3 Internal cell factors that control the dynamics of lipid rafts *57*

I.6. Lipid rafts as signaling platforms *59*

I.6.1 Signaling platform generation through lipid rafts *64*

I.7. Lipid raft dependent endocytosis *68*

I.7.1 Dynamin dependent non-caveolae endocytosis *74*

I.7.3 Lipid raft dependent endocytosis regulation. Cav1 negative regulation. Cholesterol and actin cytoskeleton role in lipid raft mediated endocytosis *76*

I.7.4 Lipid raft endocytosis and the modulation of signaling cascades *79*

I.8. Plasma membrane microdomains dependent apoptotic function *81*

I.8.1 Membrane receptors and channels apoptosis *84*

I.8.1.1 Fas *84*

I.8.1.2 CD5 ..... *85*

I.8.1.3 CD20 ..... *86*

I.8.1.4 Trpc-1 ..... *86*

I.8.2 Lipid rafts in protein kinase induced apoptosis *87*

I.8.2.1 Akt *87*

I.8.2.2 JNK *88*

I.8.2.3 Src kinase family *89*

I.8.2.4 PKC protein family *89*

I.9. Lipid raft atherogenesis and signaling mechanisms *91*

I.9.1 Transendothelial transport of low-density lipoproteins 93

I.9.1.1 The hyperlipidemic excess as stress factor in the atherogenic process induces changes in lipid raft composition 93

I.9.1.2 High density lipoproteins and statin action mechanisms and implications over the structure (composition) of lipid rafts 98

I.9.2 The inflammatory process promoted by lipid rafts 101

I.9.3 Lipid raft associated protease activity 102

I.9.4 Lipid rafts in smooth muscle cell proliferationand atherosclerosis 104

SECOND PART – ORIGINAL CONTRIBUTIONS *105*

II.1. Introduction and objectives *105*

II.2 Experimental methodology *110*

II.2.1 Reagents 110

II.2.2 Experimental animal models 111

II.2.2.1 Hamsters 111

II.2.2.2 Mice 112

II.2.3 Optical microscopy performed on cryosections 112

II.2.4 ELISA technique 113

II.2.5 Lipid raft extraction by sucrose gradient ultracentrifugation 113

II.2.6 Single dimension electrophoresis and Western blotting 114

II.2.7. 2 Dimensional differential electrophoresis (2D-DIGE) 115

II.2.8 High performance liquid chromatography mass spectrometry.MALDI-TOF mass spectrometry 122

II.2.8.1 Sample preparation for LC-MS/MS analysis 132

II.2.8.2 Liquid nano-chromatography peptide separation 133

II.2.8.3 Mass spectrometric analysis (LC-MS and MALDI-TOF) 134

II.2.8.4 LC-MS data analysis for protein identification 134

II.2.8.5 LC-MS data analysis for protein quantification 135

II.2.8.6 Identification of representative signaling pathways 137

II.2.8.7 MALDI-TOF analysis 138

II.2.9 Statistical analysis 139

II.3 Results. Experimental studies and bioinformatics *140*

II.3.1 Experimantal animal models characterisation and validation *140*

II.3.1.1 ApoE deficient mice 140

II.3.1.2 Hyperlipidemic hamsters. 142

II.3.2 Hamsters and mice isolated DRM characterisation *144*

II.3.2.1 Discussions and conlusions 151

II.3.3 2D-DIGE experimental methodology revealed substantial modifications of hyperlipidemic hamsters DRM protein profiles *154*

II.3.3.1 MALDI-TOF protein spots analysis revealed that the hyperlipidemic condition and the statin treatment significantly modified the expression of some structural and signaling molecules *163*
II.3.3.2 Discussions and conlusions *167*

II.3.4 Differential proteomic analysis of actin dependent signaling pathways of ApoE defficient mice isolaed membrane microdomains *169*

II.3.4.1 Shotgun proteomic analysis *169*
II.3.4.2 DRM proteins relative quantification *172*
II.3.4.3 Actin dependent signaling pathways DRM protein expression analysis *174*
II.3.4.4 Discussions and conlusions *180*

II.3.5 DRM resident and associated protein expression modification. Mass spectrometric analysis demonstrates Hsp regulation by the DRMs *186*

II.3.5.1 The hyperlipidemic condition induces the over-expression of caveolin-1 in DRMs *186*
II.3.5.2 The hyperlipidemic condition induces the under-expression of PTRF in DRMs *187*
II.3.5.2 The expression analysis of some Caveolin-1 co-fractionated proteins (filamin A, dynamin) *188*
II.3.5.3 The analysis of serum released and DRM localised heat shock proteins *189*
II.3.5.4 Discussions and conlusions *191*

II.3.6 The comparative proteomic analysis of DRMs isolated from two hyperlipidemic experimental models *195*

II.3.6.1 Qualitative mass spectrometric analysis *195*
II.3.6.2 DRM proteins relative quantification *201*
II.3.6.3 The analysis of Mus Musculus și Mesocricetus Auratus differentially expressed proteins implicated in common signaling pathways *205*
II.3.6.4 The signaling pathways analysis of Mus Musculus differentially expressed proteins *214*
II.3.6.5 The signaling pathways analysis of Mescocricetus Auratus differentially expressed proteins *218*
II.3.6.6 Discussions and conlusions *220*

II.4 Gereral conclusions *222*
References *226*
Abbreviations list *252*

Keywords:

Lipid rafts
Detergent resistant membrane microdomains
Pulmonary endothelium
Hyperlipidemia
Atherosclerosis
Cytoskeleton
ApoE deficient mouse
Hyperlipidemic hamster
Proteomics
Mass spectrometry

INTRODUCTION

Atherosclerosis is a disease mainly of the large and medium caliber arteries with severe clinical manifestations (atherosclerotic plaque) and often with tragic end (cardiac ischemia, lower limb gangrene, ischemic encephalopathy, myocardial infarction, cerebral infarction). Hyperlipidemia is a major risk factor in atherosclerosis, statin treatment being the most common measure to counteract the increased circulating lipid levels. The endothelial cells are the first to come into contact and are activated by pro-atherogenic factors, such as elevated levels of cholesterol and triglycerides in the circulating lipoproteins, which results in endothelial dysfunction. Pulmonary endothelium is directly involved in a number of vital functions of the body (solute exchange, regulation of vascular tone, vasculogenesis, angiogenesis) and although it does not normally develop atherosclerotic plaques, it can be activated by pro-atherogenicstress factors, (hyperlipidemicdiet, hypertension, deregulated production of nitric oxide, etc.) with implications in altering signaling pathways in the atherosclerotic plaques prone areas.

Studies have shown the importance of signaling mechanisms in the biological membranes, these structural and functional barriers actively involved in cell homeostasis. Membrane microdomains represent dynamic membrane nano-assemblies with a special protein and lipid content involved in transport, cholesterol homeostasis, etc. This particular structure determines their characteristic of being insoluble in non-ionic detergents and flotation in a density gradient following ultracentrifugation at 200000xg. Their protein profile is enriched in signaling proteins, which suggests their active involvement in not only physiological but also pathological molecular processes.

This paper aim is to investigate the alteration of the molecular mechanisms in pulmonary endothelium detergent resistant membrane microdomains following a hyperlipidemic stress on two laboratory experiment models: the ApoE deficient mouse and Golden Syrian Hamster fed with a hyperlipidemic diet.

FIRST PART – CURRENT STATE OF KNOWLADGE REGARDING LIPID RFATS AND SIGNALING MOLECULAR MECHANISMS

The "fluid mosaic" was hypothesized in 1972 (Singer and Nicolson, 1972) to explain the structural and functional organization of the plasma membrane and answered questions regarding its functions: transport processes, protection, cell-cell contact, signaling mechanisms.

Subsequent studies (Pike, 2003; Engelman, 2005) have shown that the plasma membrane is more mosaic than fluid and proposed a new model for membrane organization, in which it appears "patched" with portions segregated in different thickness and composition.

However, the concept of membrane microdomains appeared much earlier (Klausner et al., 1980; Simionescu et al., 1981, van Meer and Simons, 1983, etc.) and the “lipid raft” term was proposed in 1997 (Simons and Ikonen, 1997), describing floating islands on the membrane surface. Lipid rafts sites are enriched in cholesterol, glycosphingolipids, saturated phospholipids and specialized proteins, whose rigid packaging allow phase separation. Today, they are seen as dynamic nano-ordered protein assemblies, rich in sphingolipids and cholesterol, in which the metastable state can be activated under the influence of stimuli to attract and achieve specific lipid-lipid, protein-lipid and protein-protein interactions resulting in the formation of higher-order signaling platforms (Hancock, 2006).

Lipid raft functions in different cell types have been the study of many groups of researchers over the years. These include polarization, cell signaling, endocytosis, cholesterol homeostasis, cell-cell and cell-pathogen adhesion processes (Jacobson et al., 2007), but their most valued role is the ability to concentrate molecules involved in cell signaling. It was revealed that the coalescence of membrane microdomains results in a more efficient signaling process. Also a major feature of these microdomains, especially of caveolae (membrane subdomains) is the transport function through endocytosis and transcytosis of specific molecules in particular in endothelial cells (Palade et al., 1981, Vasile et al., 1983; Nistor and Simionescu, 1986). For example,

caveolaeare the main route of the albumin transport in endothelial cells, using a transcytosis process (Predescu et al. 1988 Antohe et al. 1991). Also, using caveolae as a transport vehicle, aminopeptidase P antibody passes the endothelium from the blood flow to the lung tissue (Oh et al. 2007).

Observations that many membrane proteins involved in cell signaling, adhesion and migration processes are located in detergent resistant membrane microdomains, together with data from studies on sterols, sphingolipids and proteins nano-assemblies in living cells, increased the interest in the biological functions of tlipid rafts and their role in inflammation and immune response. It seems that the rafts enriched in cholesterol and sphingolipidsare major regulators of atheroma pathophysiology by the activation of signaling pathways involved in the generation of atherosclerotic lesions. The type and plasma membrane lipid composition *per se* is a major determinant of protein localization in lipid rafts, and subtle changes in plasma membrane lipid composition and especially cholesterol content can result in the overall alteration of signaling pathway cascades.

Atherosclerosis is a chronic, multi-factorial disease and is one of the leading causes of death especially in developed countries (Naghavi et al., 2003). Although for a long time this pathology was seen as slow and irreversible, new knowledge in the field reveals that it is a multi-regional, dynamic and when early treated reversible process. Endothelial cells are specifically involved in the development and progression (or regression) of atherosclerotic lesions. Vascular endothelium is the first layer that interacts with different cellular stress pro-atherogenic or biochemical factors in the blood plasma, resulting in the endothelial and vascular dysfunction (Blankenberg et al., 2003; Simionescu and Antohe, 2006, Pavlides et al., 2014).

The pulmonary endothelium is directly involved in vital functions of the body, such as the exchange solution, fibrinolysis, coagulation, regulation of vasculogenesis and angiogenesis, interaction with platelets and leukocytes (Lucas, 2008). Although atherosclerotic plaques are not characteristic to this region, various studies have suggested that lung endothelium can be modulated for health improvement using angiotensin converting enzyme inhibitors and statins (Lucas, 2008 Osto et al., 2007). Published data have shown that atherosclerotic risk factors such as lipid rich diet (Uyy et al., 2013; Haraba et al., 2011), hypertension (Sellers et al., 2008), reactive oxygen

species (Lang et al. 2002), a disturbed production of nitric oxide (South et al., 2007), over-production of cytokines, chemokines (Hamacher et al., 2002, Bechara et al., 2007) and impaired coagulation and fibrinolysis processes (Lucas et al., 1997, Russell et al., 2003), can activate the pulmonary endothelium, affecting multiple signaling pathways, with significant impact on the stability of atherosclerotic plaques in the vascular areas prone to atheroma formation.

Statins are blood lipid lowering drugs, which were developed and clinically tested for regulation of cholesterol biosynthesis. Several studies measuring hemostatic parameters have also demonstrated the beneficial effects of statins on endothelial cells, including promoting the pro-fibrinolytic state (Seljeflot et al., 2002).

Given the many still unresolved issues in this field, we focused on the molecular signaling mechanisms localized at the plasma membrane level using hyperlipidemicexperimental animal models (Golden Syrian Hamsters and ApoE deficient mice) and biochemical, immunological, mass spectrometry analysis and bioinformatics tools. Using the existing methods for isolatingdetergent resistant membrane microdomains, weobservedthe DRM protein profile alteration induced by hyperlipidemic diet (associated or not with ApoE protein deficiency).

SECOND PART – ORIGINAL CONTRIUTIONS

To highlight the molecular mechanisms involved in membrane microdomains signaling affected by hyperlipidemia, we used two experimental hyperlipidemic animal models: the ApoE deficient mouse and the Syrian Golden hamster, subjected to hyperlipidemic diet. Controls were represented by a group of C57 Black mice and a group of hamsters with standard diet. Also in this study we focused on statin treatment effects following a high fat intake. Thus, after 6 weeks and 6 months of high lipid diet, the ApoE deficient mice and Syrian Golden hamsters exhibited significantly higher levels of cholesterol and triglycerides compared to control groups. Statin treatment resulted in significant decreases in serum levels of cholesterol and triglycerides. Microscopy experiments revealed lipid deposits in the heart valves successive cryosections in both hyperlipidemia groups of animals.

Membrane microdomains were isolated and purified on the basis of their insolubility by non-ionic detergents, and selective flotation in a density gradient (Sargiacomo et al. 1993). Of the 12 collected fractions following an ultracentrifugation process (200,000xg), the 4th and 5th fractions presented a higher concentration of protein, cholesterol and glycerolipids. These two fractions were combined and called non-ionic detergent resistant membrane microdomains (DRM), and subsequently used in qualitative and quantitative experiments. It was also demonstrated that the isolated DRMs were of endothelial origin, through detection of angiotensin converting enzyme peak activity in the two fractions. In addition, we observed an increased activity in the ApoE deficient mice group that received a hyperlipidemicdiet and the statin treatment one, thus suggesting endothelial activation due to hyperlipidemicstress. DRM isolation validation was performed using immunological experiments and mass spectrometry data.

DRMs isolated from the hamsters groups were solubilized and purified for protein extraction. The proteinswereprelabeled with fluorescent cyanine dyes and subjected to isoelectric focusing separation (according to the isoelectric point) and single dimension electrophoresis (for separation according to molecular weight) using the 2D-DIGE

approach. Using an imaging system based on laser scanning together with high-performance bio-informatics analysis, we detected ~ 1500 different protein spots in the range of 4-9pH. Also, the 2D-DIGE technique allowed us to obtain a good reproducibility between the analyzed samples, which resulted in a high degree of confidence in subsequent quantitative analysis which revealed 48 differently expressed protein spots between the control group and those receiving statin treatment, 85 spots with altered abundance determined by the hyperlipidemia diet and statin treatment. In total, over 200 protein spots were observed with significantly altered intensity. These spots were automatically excised from gels and processed for mass spectrometry analysis using a MALDI-TOF system and the Peptide Mass Fingerprinting technique. This led to the identification of structural proteins (actin variants, vimentin, tubulin, myosin), cytokines (interferon, interleukins), various signaling molecules (GTPases, receptors, HSPs, etc.) of trafficking and cellular transport proteins (annexin ATP synthase, membrane channels, etc.), and numerous enzymes (synthases, reductases, dehydrogenases, nucleotidase, caspases, etc.). Among these molecules, we observed that the hyperlipidemic diet resulted in the over-expression (beta actin, vimentin, interferon, interleukin-1 precursor, inositol phosphatase F, caspase-12, annexin A3 and fatty acid synthase), or under-expression (tubulin, Ras, Grp94) of some molecules. Statin therapy resulted in abundance decrease for some protein spots to a level comparable to the control (HDL binding protein, annexin A3, Grp94), and an inverse effect for others(MHC class II antigen, CRA kinase, protein trafficking of nitric oxide synthase).

High performance techniques based on mass spectrometry coupled with nano-liquid chromatography were applied for qualitative and relative quantitative analysis of mice isolated DRMs. Using the MudPIT approach we identified 1279 proteins in the control group, 1233 in the hyperlipidemic one and 1239 in the group of mice that received statin therapy. Gene Ontology based analysis revealed that, in terms of *Cellular Components*, most of the identified proteins were indeed of membrane origin. However, we also identified with high confidence proteins of nuclear, cytoskeletal, cytosolic, mitochondrial and extracellular origin. The distribution of proteins based on *Biological Process* demonstrated the proteins' primary role in metabolic processes, regulation of biological processes, response to stimuli, cell organization and biogenesis,

cell communication, development and cell differentiation. Classification based on *Molecular Functions* demonstrated a main representation of proteins in molecular interaction events, but also in catalytic activity, interaction with nucleotide, metal ions binding activity and molecular structure. The relative quantification analysis revealed 654 significantly differentially expressed proteins in the hyperlipidemicand statin treatment groups relative to the control. Their spatial distribution by Principal Component Analysis revealed a very good differentiation between the three DRM protein groups. 29 of these proteins were closely related to cytoskeleton-DRM interaction sites. Their analysis revealed that hyperlipidemia stress statin therapy affectedthree over-represented KEGG signaling pathways: *Regulationof Actin Cytoskeleton, Focal Adhesion and Adherence Junction*.

Moreover, immunological, biochemical and mass spectrometry studies were employed to highlight a number of DRM resident or associated protein molecules with significantly altered abundance caused by the hyperlipidemic stress and statin therapy. Thus, it was demonstrated that the cardiopulmonary dysfunction affected the expression of caveolin-1 (significantly over-expression), and PTRF (significantly under-expression). Also we demonstrated co-fractionation and altered expression of dynamin (under-expression caused by the hyperlipidemic condition),filamine (over-expressiondue to the hyperlipidemicstress), Hsp70 (significantly increased expression in the hyperlipidemic mice group) and Hsp90 (significantly decreased expression in the hyperlipidemic group) in the isolated DRMs. These results led to the correlation of secreted HSPs serumand tissue levels, emphasizing the possible role of DRM in their transport and regulation.

High-performance nano-chromatography mass spectrometry experiments were performed for the DRM protein profiles hyperlipidemic mice and hamsters comparison. The high percentage (~ 65%) of identified hamster proteins attributed to the MusMusculusorganism together with their similar characteristic chromatographic profiles, demonstrateda high degree of sequence homology between the two organisms. Also, the Gene Ontology data analysis performed with Protein Center, revealed similar protein profiles, the majority of them being of membrane, extracellular, cytoskeletal, nuclear and mitochondrial origin, with roles in metabolic processes, response to stimuli, cellular organization and biogenesis, involved inprotein and

nucleotide binding and catalytic activity. The relative quantitative analysis revealed 830 proteins whose abundanceswere altered by hyperlipidemia and statin therapy. The 422 different proteins uniquely assigned to the mice group were found in the following overrepresented KEGG signaling pathways: Antigen Processing and Presentation, TCA and Drug Metabolism. In the hamster groups alone, 288 proteins were found with significantly altered expressions that were involved in Adhesion Junctions and Oxidative Phosphorylation. Interestingly, hyperlipidemia acted on a common pool of 120 proteins in both animal models. These were involved in Leukocyte Transendothelial Migration, Tight Junctions,Oxidative Phosphorylation and Phagosome pathways.

References:

1. Antohe F, Heltianu C, Simionescu M. 1991. Albumin binding proteins of endothelial cells: immunocytochemical detection of the 18kDa peptide. Eur. J. Cell Biol., 56, 34-42.
2. Bechara C, Chai H, Lin PH, Yao Q, Chen C., 2007. Growth related oncogene-alpha (GRO-alpha): roles in atherosclerosis, angiogenesis and other inflammatory conditions. Med SciMonit 13:RA87-90.
3. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L., 2003. Adhesion molecules and atherosclerosis. Atherosclerosis 170:191-203.
4. Engelman DM. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. Nature 438: 578–580.
5. Hamacher J, Lucas R, Lijnen HR, Buschke S, Dunant Y, Wendel A, et al., 2002. Tumor necrosis factor-alpha and angiostatin are mediators of endothelial cytotoxicity in bronchoalveolar lavages of patients with acute respiratory distress syndrome. Am J RespirCrit Care Med 166:651-6.
6. Hancock JF. 2006. Lipid rafts: Contentious only from simplistic standpoints. Nat Rev Mol Cell Biol 7: 456–462.
7. Haraba R, Suica VI, Uyy E, Ivan L, Antohe F., 2011. Hyperlipidemia stimulates the extracellular release of the nuclear high mobility group box 1 protein. Cell Tissue Res 346:361-8.
8. Jacobson K, Mouritsen OG, Anderson RGW. 2007. Lipid rafts: At a crossroad between cell biology and physics. Nat Cell Biol 9: 7–14.
9. Klausner, R.D., Kleinfeld, A.M., Hoover, R.L. and Karnovsky, M.J. 1980. Lipid domains in membranes. Evidence derived from structural perturbations induced by free fatty acids and lifetime heterogeneity analysis. J. Biol. Chem. 255, 1286–1295
10. Lang JD, McArdle PJ, O'Reilly PJ, Matalon S., 2002. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. Chest 122:314S-20S.
11. Lucas R, Lou J, Morel DR, Ricou B, Suter PM, Grau GE., 1997. TNF receptors in the microvascular pathology of acute respiratory distress syndrome and cerebral malaria. J LeukocBiol 61:551-8.
12. Lucas R., 2008. Recent advances on the role of the endothelium in pulmonary function and disease. VasculPharmacol 49:111-2.
13. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J et al., 2003. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for a new definitions and risk assessement strategies: part I. Circulation 108:1664–1672
14. Nistor A, Simionescu M., 1986. Uptake of low density lipoproteins by the hamster lung. Interactions with capillary endothelium. Am Rev Respir Dis.; 134(6):1266-72.
15. Oh, P., Borgstrom, P., Witkiewicz, H., Li, Y., Borgstrom, B.J., Chrastina, A., et al., 2007. Live dynamic imaging of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung. Nat. Biotechnol. 25, 327–337.
16. Osto E, Coppolino G, Volpe M, Cosentino F., 2007. Restoring the dysfunctional endothelium. Curr Pharm Des 13:1053-68.
17. Palade GE, Simionescu M, Simionescu N., 1981. Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. Biorrheology, 17, 563-568, 1981.
18. Pavlides S, Gutierrez-Pajares JL, Iturrieta J, Lisanti MP, Frank PG., 2014. Endothelial caveolin-1 plays a major role in the development of atherosclerosis. Cell Tissue Res 356:147-57
19. Pike, L.J. 2003. Lipid rafts: bringing order to chaos. J. Lipid Res. 44, 655–667
20. Predescu D, Simionescu N, Simionescu M, Palade GE. 1988. Binding and transcytosis of glycoalbumin by the microvascular endothelium of the murine myocardium. Evidence that the glycoalbumin behaves as a bifunctional ligand. J. Cell Biol., 107, 1729-1738.
21. Russell JA., 2003. Genetics of coagulation factors in acute lung injury. Crit Care Med 31:S243-7.
22. Sargiacomo M, Sudol M, Tang ZL, LisantiMP., 1993. Signal transducing molecules and GPI-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. J Cell Biol 122:789–807
23. Seljeflot I, Tonstad S, Hjermann I, Arnesen H., 2002. Improved fibrinolysis after 1-year treatment with HMG CoA reductase inhibitors in patients with coronary heart disease. Thromb Res 105:285-90.
24. Sellers MM, Stallone JN., 2008. Sympathy for the devil: the role of thromboxane in the regulation of vascular tone and blood pressure. Am J Physiol Heart CircPhysiol 294:H1978-86.

25. Simionescu M, Antohe F., 2006. Functional ultrastructure of the vascular endothelium—changes in various pathologies. In: Moncada S, Higgs A (eds) Handbook of physiology and bichemistry, vol 176/I. Springer, Berlin, pp 41–69
26. Simionescu N, Simionescu M, Palade GE., 1981. Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. I. Preferential distribution of anionic sites. J. Cell Biol., 90, 605-613.
27. Simons K, Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. Nature 387: 569–572.
28. Singer, S.J. and Nicolson, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175, 720–731
29. Sud N, Sharma S, Wiseman DA, Harmon C, Kumar S, Venema RC, et al., 2007. Nitric oxide and superoxide generation from endothelial NOS: modulation by HSP90. Am J Physiol Lung Cell MolPhysiol 293:L1444-53.
30. Uyy E, Ivan L, Boteanu RM, Suica VI, Antohe F., 2013. High-fat diet alters protein composition of detergent-resistant membrane microdomains. Cell Tissue Res 354:771-81.
31. van Meer, G. and Simons, K. 1983. An efficient method for introducing defined lipids into the plasma membrane of mammalian cells. J. Cell Biol. 97, 1365–1374
32. Vasile E, Simionescu M, Simionescu N., 1983. Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low-density lipoprotein in the arterial endothelium in situ. J Cell Biol. Jun;96(6):1677-89.

ACADEMIA ROMÂNĂ

INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ

„NICOLAE SIMIONESCU”

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

PROTEOMICA *RAFT*-URILOR LIPIDICE ȘI MECANISMELE MOLECULARE IMPLICATE ÎN SEMNALIZARE ÎN MODELE EXPERIMENTALE DE HIPERLIPIDEMIE

Conducător de doctorat

Dr. Antohe Felicia

Doctorand

Șuică Viorel-Iulian

București

2014

Conținut:

INTRODUCERE 10

PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTINȚELOR PRIVIND *RAFT*-URILE LIPIDICE ȘI MECANISME MOLECULARE IMPLICATE ÎN SEMNALIZARE 11

I.1. Noțiuni introductive 11

I.2. Membrana celulară ca bază a organizării microdomeniilor membranare 14

I.2.1 Lipidele ca parte integrantă a membranelor celulare și a microdomeniilor membranare 14

I.2.2 Bistratul lipidic și asimetria membranară 16

I.2.3 Sterolii și colesterolul – constituenți majori ai microdomeniilor membranare 19

I.3. Conceptul de r*aft-uri* lipidice (microdomenii membranare) 21

I.4. Dinamica moleculelor membranei plasmatice și a microdomeniilor membranare 36

I.4.1 Metode biochimice și biofizice de investigare a dinamicii *raft-urilor* lipidice 38

I.4.2 Stabilitatea *raft-urilor* lipidice generată de relația dintre dimensiune și timpul de viață 41

I.4.3 Modelarea și destabilizarea *raft*-urilor lipidice 45

I.5. Funcționalitatea dinamică a *raft*-urilor lipidice determinată de factori externi, membranari și citosolici 49

I.5.1 Factori externi care controlează dinamica *raft*-urilor 50

I.5.2 Controlul dinamicii *raft-urilor* lipidice la nivelul membranei plasmatice 52

I.5.3 Controlul dinamicii *raft-urilor* de către factori intracelulari 57

I.6. *Raft-urile* lipidice ca platformă de semnalizare 59

I.6.1 Formarea platformei de semnalizare prin *raft*-uri lipidice 64

I.7. Funcția de endocitoză dependenta de *raft*-uri lipidice/caveole 68

I.7.1 Endocitoza noncaveolară dependentă de dinamină 74

I.7.2 Endocitoza noncaveolară independentă de dinamină 74

I.7.3 Reglarea endocitozei dependentă de *raft-uri*. Reglarea negativă prin Cav1. Rolul colesterolului și a citoscheletului actinic în endocitoza mediată de *raft*-uri 76

I.7.4 Endocitoza prin *raft-uri* și modularea cascadelor de semnalizare 79

I.8. Funcția apoptotică dependentă de microdomenii membranare plasmatice 81

I.8.1 Apoptoza prin receptori membranari și canale 84

I.8.1.1 Fas 84

I.8.1.2 CD5 85

I.8.1.3 CD20 86

I.8.1.4 Trpc-1 86
I.8.2 Rolul *raft*-urilor lipidice în apoptoza indusă de protein kinaze 87
I.8.2.1 Akt 87
I.8.2.2 JNK 88
I.8.2.3 Familia de kinaze Src 89
I.8.2.4 Familia de proteine PKC 89
I.9. Aterogeneza și mecanisme de semnalizare prin *raft-uri* lipidice 91
I.9.1 Transportul transendotelial al lipoproteinelor de joasă densitate 93
I.9.1.1 Excesul hiperlipidemic ca factor de stres în procesul aterogenic induce modificarea compoziției *raft*-urilor lipidice 93
I.9.1.2 Mecanismele de acțiune a lipoproteinelor de înaltă densitate și a statinelor și implicații asupra structurii (compoziției) *raft*-urilor lipidice 98
I.9.2 Procesul inflamator promovat prin *raft*-uri lipidice 101
I.9.3 Activitatea protează asociată *raft*-urilor lipidice 102
I.9.4 Implicarea *raft*-urilor lipidice în proliferarea celulelor musculare netede cu implicații în ateroscleroza 104
PARTEA A II-A – CONTRIBUȚII ORIGINALE 105
II.1. Introducere și obiective 105
II.2 Metodologie experimentală 110
II.2.1 Reactivi 110
II.2.2 Modele experimentale 111
II.2.2.1 Hamsteri 111
II.2.2.2 Șoareci 112
II.2.3 Microscopie optică pe criosecțiuni 112
II.2.4 Tehnica ELISA 113
II.2.5 Izolarea raft-urilor lipidice prin ultracentrifugare în gradient de sucroză 113
II.2.6 Electroforeza unidimensională și *Western blotting* 114
II.2.7 Electroforeza diferențială bidimensională (2D-DIGE) 115
II.2.8 Spectrometria de masă de mare performanță cuplată cu cromatografie de lichide. Spectrometria de masă de tip MALDI-TOF 122
II.2.8.1 Prepararea probelor pentru analiza LC-MS/MS 132
II.2.8.2 Separarea peptidelor prin nano-cromatografie de lichide 133
II.2.8.3 Analiza spectrometrică de masă (LC-MS și MALDI-TOF) 134

II.2.8.4 Prelucrarea datelor spectrometrice de masă (LC-MS) pentru identificarea proteică 134
II.2.8.5 Prelucrarea datelor spectrometrice de masă (LC-MS) pentru cuantificarea proteică 135
II.2.8.6 Identificarea căilor de semmnalizare reprezentative pentru proteomul identificat.....137
II.2.8.7 Analiza MALDI-TOF 138
II.2.9 Analiza statistică 139
II.3 Rezultate. Studii experimentale și prelucrarea bioinformatică a datelor.....140
II.3.1 Validarea și caracterizarea modelelor experimentale.....140
II.3.1.1 Șoarecii ApoE deficienți 140
II.3.1.2 Hamsterii hiperlipidemici.....142
II.3.2 Caracterizarea DRM-urilor izolate de la loturile de șoareci și hamsteri 144
II.3.2.1 Discuții și concluzii 151
II.3.3 Metodologia experimentală 2D-DIGE a relevat modificări substanțiale la nivelul profilelor proteice bidimensionale ale DRM-urilor izolate de la hamsterii hiperlipidemici 154
II.3.3.1 Analiza spoturilor cu sistemul de spectrometrie de masă MALDI-TOF a relevat că hiperlipidemia și tratamentul cu statină alterează expresiile unor proteine structurale și de semnalizare 163
II.3.3.2 Discuții și concluzii 167
II.3.4 Analiza proteomică diferențială a căilor de semnalizare dependente de actină din microdomenii membranare în ateroscleroza experimentală a șoarecilor ApoE deficienți.....169
II.3.4.1 Analiza proteomică de tip *Shotgun*.....169
II.3.4.2 Cuantificarea relativă a proteinelor identificate în DRM-uri 172
II.3.4.3 Analiza expresiei proteinelor din DRM-uri în căile de semnalizare dependente de actină174
II.3.4.4 Discuții și concluzii 180
II.3.5 Modificarea expresiei unor proteine rezidente ori atașate DRM-urilor. Spectrometria de masă demonstrează rolul reglator al DRM-urilor asupra Hsp-urilor 186
II.3.5.1 Hiperlipidemia induce o creștere a expresiei proteice a caveolinei-1 în DRM-uri 186
II.3.5.2 Hiperlipidemia induce expresia proteică scăzută a PTRF în DRM-uri 187
II.3.5.2 Expresia unor proteine co-fracționate cu proteina caveolină-1 (filamină A, dinamină) .188
II.3.5.3 Hsp-urile eliberate în ser și localizarea acestora în DRM-uri 189
II.3.5.4 Discuții și concluzii 191
II.3.6 Analiza comparativă proteomică a microdomeniilor membranare izolate de la două modele experimentale de hiperlipidemie 195
II.3.6.1 Analiza spectrometrică de masă calitativă 195

II.3.6.2 Cuantificarea relativă a proteinelor identificate în DRM-uri 201

II.3.6.3 Mecanisme moleculare comune în care sunt implicate proteinele diferit exprimate în probele izolate de la *Mus Musculus și Mesocricetus Auratus* 205

II.3.6.4 Căi de semnalizare în care sunt implicate proteinele diferit exprimate izolate din DRM-urile din *Mus Musculus* 214

II.3.6.5 Căi de semnalizare în care sunt implicate proteinele diferit exprimate izolate din DRM-urile din *Mescocricetus Auratus* 218

II.3.6.6 Discuții și concluzii 220

II.4 Concluzii generale 222

Bibliografie 226

Lista de abrevieri 252

Cuvinte cheie:

Raft-uri lipidice
Microdomenii membranare rezistente la solubilizarea cu detergenți
Endoteliu pulmonar
Hiperlipidemie
Ateroscleroză
Citoschelet
Șoarece ApoE deficient
Hamster hiperlipidemic
Proteomică
Spectrometrie de masă

INTRODUCERE

Ateroscleroza reprezintă o maladie în special a arterelor de calibru mare și mediu cu manifestări clinice severe (plăci aterosclerotice) și finalitate tragică (ischemie cardiacă, cangrena membrelor inferioare, encefalopatie ischemică, infarct miocardic, infarct cerebral). Hiperlipidemia este un factor major de risc in ateroscleroză, conținutul crescut de lipide circulante fiind de obicei contracarat prin tratament cu statine.

Celulele endoteliale sunt primele care iau contact și sunt activate de factorii pro-aterogenici, ca de exemplu nivelele crescute de colesterol și trigliceride din lipoproteinele circulante, care le determină disfuncționalitatea. Endoteliul pulmonar este implicat direct într-o serie de funcții vitale organismului (schimb de soluți, reglarea tonusului vascular, vasculogeneză, angiogeneză) și deși nu dezvoltă în mod normal plăci aterosclerotice, acesta poate fi activat de factorii stresanți, pro-aterogenci (dietă hiperlipidemică, hipertensiune, producție dereglată de oxid nitric, etc.) cu implicații în alterarea căilor de semnalizare din zonele predispuse la apariția plăcilor.

Studiile de specialitate au dovedit importanța majoră a mecanismelor de semnalizare de la nivelul membranelor biologice, bariere structurale și funcționale implicate activ în homeostazia celulei. Microdomeniile membranare reprezintă nano-ansamble dinamice din componența membranelor, cu un conținut proteic și lipidic special și rol în reglarea transportului celular, homeostazia colesterolului, etc. Structura particulară a acestora determină caracteristica de a fi insolubile în detergenții non-ionici și flotația într-un gradient de densitate ca urmare a ultracentrifugării la 200000xg. Profilul proteic, îmbogățit în proteine de semnalizare, sugerează implicarea activă a lor în procese moleculare fiziologice, dar și patologice.

Prezenta lucrare a avut ca scop investigarea mecanismelor moleculare de la nivelul microdomeniilor membranare izolate din endoteliul pulmonar, ca urmare a inducerii unui stres hiperlipidemic în două modele experimantale de laborator: șoarecele ApoE deficient și Hamsterul Sirian Auriu supus unei diete hiperlipidemice.

PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTINȚELOR PRIVIND *RAFT*-URILE LIPIDICE Și MECANISME MOLECULARE IMPLICATE ÎN SEMNALIZARE

Modelul „mozaicului fluid” a fost enunțat în 1972 (Singer și Nicolson, 1972) pentru explicarea organizării structurale și functionale a membranei plasmatice. Acesta raspundea la întrebările referitoare la rolurile pe care membrana plasmatică le îndeplinește: procese de transport, protecție, contacte celula-celula, mecanisme de semnalizare.

Studiile ulterioare (Pike, 2003; Engelman, 2005) au dovedit că membrana plasmatica este mai mult mozaic decât fluid, propunându-se un nou model de organizare membranara, în care aceasta apare „peticită”, cu porțiuni segregate, distincte în grosime și compoziție.

Totuși, conceputul de microdomenii membranare a apărut mult mai devreme (Klausner et al., 1980; Simionescu et al., 1981; van Meer și Simons, 1983, etc.) iar denumirea de *raft*-uri lipidice a fost propusă in 1997 (Simons și Ikonen, 1997), acestea fiind descrise ca insule plutitoare de pe suprafața membranei. *Raft*-urile lipidice sunt îmbogățite în colesterol, glicosfingolipide, fosfolipide saturate, a căror împachetare rigidă permite o separare de fază, dar și proteine specializate. În prezent, acestea sunt văzute ca nano-ansamble proteice ordonate, dinamice, bogate în sfingolipide și colesterol, în care starea de repaus metastabilă poate fi activată sub acțiunea unor stimuli să atragă și să realizeze interacțiuni specifice lipid-lipid, proteină-lipid și proteină-proteină cu formarea unor platforme de semnalizare (Hancock, 2006).

Funcțiile *raft*-urilor lipidice în diferite tipuri celulare a reprezentat domeniul de studiu pentru multe grupuri de cercetători de-a lungul anilor. Printre acestea se numără polarizarea, semnalizare celulara, endocitoza, homeostazia colesterolului, procese de adeziune celulă-celulă și celulă-factor patogen (Jacobson et al., 2007), însă cel mai apreciat rol al acestora este posibilitatea de recrutare și concentrare a moleculelor implicate în semnalizarea celulară. S-a evidențiat că prin coalescența microdomeniilor membranare se eficientizează procesul de semnalizare. De asemenea o caracteristică majoră a microdomeniilor membranare, în special a caveolelor (subdomeniu

membranar) este funcția de transport realizată prin endocitoză și transcitoză unor molecule specifice în particular în celulele endoteliale (Palade et al., 1981; Vasile et al., 1983; Nistor și Simionescu, 1986). De exemplu, caveolele reprezintă principala rută de transport a albuminei în celulele endoteliale, printr-un proces de transcitoză (Predescu et al., 1988, Antohe et al., 1991). De asemenea, prin caveole se realizează transportul anticorpilor împotriva aminopeptidazei P din fluxul sangvin prin endoteliu către țesutul pulmonar (Oh et al., 2007).

Observațiile că numeroase proteine membranare implicate în semnalizare celulară, procese de adeziune și migrare, sunt localizate în microdomeniile membranare, împreună cu datele furnizate de studiile pe nano-ansamble de steroli, sfingolipide și proteine în celule vii, a crescut interesul privind funcțiile biologice ale *raft*-urilor lipidice și în special rolul acestora în inflamație și răspunsul imun. Se pare că microdomeniile îmbogățite în colesterol și sfingolipide sunt reglatori majori ai patofiziologiei ateromului prin declanșarea căilor de semnalizare implicate în generarea leziunilor aterosclerotice. Tipul și compoziția lipidică a membranei plasmatice *per se* reprezintă un determinant major în localizarea proteinelor în *raft*-uri lipidice, iar schimbări subtile în compoziția lipidică a membranei plasmatice și în special în conținutul de colesterol pot rezulta în modificări generale ale cascadelor de semnalizare.

Ateroscleroza a fost percepută multă vreme ca un proces lent și ireversibil. Noile cunoștințe în domeniu relevă însă faptul ca aceasta este un proces multi-zonal, dinamic și totodată reversibil atunci când tratamentul este aplicat din timp. Celulele endoteliale sunt în mod special implicate în dezvoltarea și progresia (sau regresia) leziunilor aterosclerotice. Endoteliul vascular este primul strat celular care interacționează cu diferiți factori de stres pro-aterogeni sau modificări biochimice de la nivelul plasmei sangvine, în urma cărora se activează, stare care se traduce prin disfuncție endotelială și vasculară (Blankenberg et al., 2003; Simionescu și Antohe, 2006; Pavlides et al., 2014).

Endoteliul pulmonar este implicat activ in realizarea funcțiilor vitale ale organismului, precum schimbul de soluți, fibrinoliză, coagulare, reglarea vasculogenezei și angiogenezei, interacția cu plachetele și leucocitele (Lucas, 2008). Deși plăcile

aterosclerotice nu se dezvoltă în mod normal în vasculatura pulmonară, diferite studii sugerează ca endoteliul pulmonar în mod particular reprezintă un situs biologic determinant, care poate fi modulat pentru îmbunătățirea sănătății folosind inhibitori pentru enzima de conversie a angiotensinei și statine (Lucas, 2008, Osto et al., 2007). Date publicate au demonstrat că factori de stres aterosclerotici precum dieta bogată în lipide (Uyy et al., 2013; Haraba et al., 2011), hipertensiunea (Sellers et al., 2008), speciile reactive de oxigen (Lang et al., 2002), o producție dereglată de oxid nitric (Sud et al., 2007), supra-producția de citokine, chemokine (Hamacher et al., 2002; Bechara et al., 2007) și dereglarea proceselor de coagulare și fibrinoliză (Lucas et al., 1997; Russel et al., 2003), pot activa endoteliul pulmonar, afectând multiple căi de semnalizare, cu impact semnificativ asupra stabilității plăcilor aterosclerotice din zonele vasculare predispuse la apariția acestora.

Statinele sunt medicamente care scad nivelul lipidelor din sânge, fiind dezvoltate și testate clinic pentru caracteristicile speciale de a regla biosinteza colesterolului. Diferite studii de măsurare a parametrilor hemostatici au demonstrat de asemenea efectele benefice ale statinelor asupra celulelor endoteliale, inclusiv promovarea unei stări pro-fibrinolitice (Seljeflot et al., 2002).

Având in vedere numeroasele aspecte nerezolvate încă, ne-am propus ca obiectiv general sa ne concentrăm asupra mecanismelor moleculare de semnalizare localizate la nivelul membranei plasmatice utilizând modele animale experimentale de hiperlipidemie (Hamsteri Sirieni Aurii și șoareci ApoE deficienți) și analize biochimce, de spectrometrie de masa și bioinformatice. Utilizând metodele deja existente pentru separarea microdomeniilor membranare, am urmărit modificările induse de dieta hiperlipidemică asociată sau nu cu modificări genice (deficiențăîn gena ApoE) în compoziția proteică a microdomeniilor membranare insolubile în detergenți non-ionici (DRM) și am analizat modificarea proteomului și a căilor de semnalizare alterate.

PARTEA A II-A – CONTRIBUȚII ORIGINALE

Pentru evidențierea mecanismelor moleculare implicate în semnalizare localizate la nivelul microdomeniilor membranare în hiperlipidemie, am utilizat două modele experimentale de animale de laborator hiperlipidemice: șoarecele ApoE deficient și Hamsterul Sirian Auriu, supuși unor diete hiperlipidemice. Controalele au fost reprezentate de un lot de șoareci C57 Black, respectiv un lot de hamsteri cu dietă standard. De asemenea, în acest studiu au mai fost folosite loturi de animale care după dieta hiperlipidemică au fost trecuți pe dietă standard, în paralel cu un tratament cu statină. Astfel, după dieta hiperlipidemică, șoarecii ApoE deficienți și Hamsterii Sirieni Aurii au prezentat nivele semnificativ crescute de colesterol și trigliceride serice față de loturile control. Tratamentul cu statină a determinat scăderea semnificativă a nivelelor de colesterol și trigliceride serice. Experimente de microscopie optică au evidențiat depozite lipidice la nivelul valvelor cardiace prelevate în serie prin crioprotecție și secționate la criotom în ambele loturi hiperlipidemice ale celor două tipuri de animale.

Microdomeniile membranare au fost izolate și purificate pe baza caracteristicii acestora de a fi rezistente la solubilizarea cu detergenți non-ionici și a flotației selective într-un gradient de densitate (Sargiacomo et al., 1993). Din cele 12 fracții colectate în urma ultracentrifugării la 200000xg s-a evidențiat o concentrație crescută de proteine, colesterol și glicerolipide in fractiile 4 și 5, de la interfața dintre soluțiile de 5%, respectiv 30% sucroză. Aceste 2 fracții au fost combinate și numite microdomenii membranare rezistente la solubilizarea cu detergenți non-ionici (DRM), fiind ulterior utilizate în experimentele calitative și cantitative. S-a demonstrat de asemenea, originea preponderent endotelială a microdomeniilor izolate, prin detectarea maximului de activitate al enzimei de conversie a angiotensinei, la nivelul celor două fracții amintite. În plus, s-a observat o activitate crescută la nivelul șoarecilor ApoE deficienți care au primit o dietă hiperlipidemică și a celor care au primit tratament cu statină, sugerându-se astfel activarea endoteliului ca urmare a stresului hiperlipidemic. Validarea izolarii

microdomeniilor membranare s-a realizat prin experimente imunologice și de spectrometrie de masă.

DRM-urile extrase de la loturile de hamsteri au fost solubilizate și purificate pentru extracție proteică. Acestea au fot premarcate cu cianine fluorescente și supuse focalizării izoelectrice pentru separarea în funcție de punctul izoelectric și electroforezei unidimensionale pentru separare în funcție de greutatea moleculara (2D-DIGE). Folosirea unui sistem de imagistică pe baza de scanare, foarte performant împreună cu analiza bio-informatica ulterioara, au permis detecția a ~1500 de spoturi proteice diferite în domeniul de pH 4-9. Tehnica 2D-DIGE utilizată a permis de asemenea obținerea unei foarte bune reproductibilități între probele analizate, ceea ce a determinat un grad înalt de confidență în analiza cantitativă ulterioară. În urma acesteia, s-au evidențiat 48 de spoturi proteice diferit exprimate între grupul control și cel care a primit tratament cu statină, 85 de spoturi cu abundență alterată determinată de dieta hiperlipidemică și tratamentul cu statina, în total observându-se peste 200 de spoturi proteice cu expresii alterate. Spoturile astfel analizate au fost excizate în mod automat din geluri și procesate pentru analiza spectrometrica de masă utilizând un sistem de tip MALDI-TOF prin *Peptide Mass Fingerprinting*. Aceasta a relevat identificarea unor proteine de natură structurală (variante de actină, vimentină, tubulină, miozină), citochine (interferon, interleuchine), a diferite molecule cu rol general în semnalizare (GTP-aze, receptori, Hsp-uri, etc), a unora cu rol în trafic și transport celular (anexină, ATP-sintază, canale membranare, etc), precum și numeroase enzime (sintaze, reductaze, dehidrogenaze, nucleotidaza, caspaze, etc). Dintre aceste molecule, s-a observat că dieta hiperlipidemică a acționat prin creșterea expresiei unor molecule (beta actinei, vimentinei, interferonului, precursorului interleukinei-1, inozitol fosfatazei F, caspazei-12, anexinei A3 și sintazei de acid gras), pe când în cazul altora aceasta a fost diminuată (tubulină, Ras, Grp94). Tratamentul cu statină a determinat scăderea abundenței până la un nivel comparabil cu controlul (*HDL binding protein*, anexina A3, Grp94), dar și un efect invers în cazul antigenului MHC de clasa II, kinazei CRA, proteinei de trafic a sintazei oxidului nitric .

Tehnica de înaltă performanța bazată pe spectrometrie de masă cuplată cu nano-cromatografia de lichide a fost aplicată pentru analiza calitativă și cantitativă

relativă a DRM-urilor extrase de la loturile de șoareci. Astfel, prin tehnica *MudPIT*, au fost identificate 1279 de proteine în grupa control, 1233 în cea hiperlipidemică și 1239 la nivelul grupei de șoareci care a primit tratament cu statină. Analiza în bazele de date de *Ontologie Genică* au relevat că, din punct de vedere al *Componentei Celulare*, majoritatea proteinelor identificate sunt într-adevăr de origine membranara. Totuși, s-au identificat cu mare confidență și proteine de origine nucleară, citoscheletală, citosolică, mitocondrială și extracelulară. Distribuția proteinelor pe baza *Procesului Biologic* a demonstrat un rol principal al acestora în procese metabolice, reglarea proceselor biologice, răspuns la stimuli, organizare celulară și biogeneză, comunicare celulară, dezvoltare și diferențiere celulară. Categoria de *Funcții Moleculare* ale proteinelor este bazată pe același tip de evaluare și a demonstrat o principală reprezentare a proteinelor în evenimente de interacție moleculară, dar și în activitate catalitică, interacție cu nucleotide, legarea ionilor metalici și activitate structurală moleculară. În urma analizei de cuantificare relativă, s-au obtinut 654 de proteine diferit exprimate în grupele hiperlipidemice și cu tratament cu statină relativ la grupa control. Distribuția spațială cantitativă a acestora, prin *Analiza Componenților Principali*, a relevat o diferențiere foarte buna a grupelor de DRM-uri luate în lucru. Dintre proteinele diferit exprimate în mod semnificativ, 29 de proteine au fost strâns corelate cu interacția citoschelet-DRM-uri. Analiza acestora a relevat că stresul hiperlipidemic și tratamentul cu statină afectează în mod particular următoarele căi de semnalizare *KEGG*, care au fost găsite suprareprezentate din punct de vedere statistic: *Reglarea Citoscheletului Actinic*, *Adeziune Focala* și *Joncțiuni Aderente*.

De asemenea, prin studii imunologice, biochimice și de spectrometrie de masa au fost evidențiate molecule proteice rezidente ori asociate DRM-urilor extrase din loturile de șoareci, a căror expresie a fost alterată semnificativ de stresul hiperlipidemic și tratamentul cu statină. Astfel, s-a demonstrat că disfuncția cardiopulmonară apărută ca urmare a hiperlipidemiei, afectează expresia caveolinei-1, aceasta crescând în mod semnificativ, dar și a PTRF, care scade semnificativ. De asemenea, s-a demonstrat co-fracționarea și alterarea expresiei dinaminei (care scade semnificativ în grupa hiperlipidemică), filaminei (care crește in grupa hiperlipidemică), a Hsp70 (expresie semnificativ crescutăîn grupa hiperlipidemică) și Hsp90 (expresie semnificativ scazută

în grupa hiperlipidemică) cu DRM-urile izolate. Rezultatele obținute au dus la corelarea nivelului secretat în ser al Hsp-urilor menționate cu nivelul tisular al acestora, evidențiindu-se un posibil rol transportor și reglator al DRM-urilor.

Prin experimente de spectrometrie de masă de înaltă performanță, s-a realizat compararea profilelor proteice ale DRM-urilor izolate de la lotul de șoareci și de la lotul de hamsteri. Prin procentul mare de proteine identificate atribuite organismului Mus Musculus în grupele de hamsteri (~65%), precum și prin evaluarea profilelor cromatografice, s-a demonstrat înalta omologie a celor doua organsime. De asemenea, analiza de Ontologie Genică realizată cu Protein Center, a evidențiat profilul asemănător al proteinelor identificate de la cele doua loturi, majoritatea fiind de origine membranară, extracelulară, citoscheletală, nucleară și mitocondrială, cu rol în procese metabolice, răspuns la stimuli, organizare celulară și biogeneză, fiind implicate în interacție proteică, activitate catalitică și legarea nucleotidelor. Analiza cantitativă relativă a relevat 830 de proteine a căror abundență este modificată de hiperlipidemie și tratamentul cu statina. Cele 422 de proteine diferit exprimate și unic atribuite lotului de șoareci au fost găsite în căile KEGG de semnalizare suprareprezentate statistic: *Procesarea și Prezentarea Antigenului*, *Calea TCA* și *Metabolismul Medicamentelor*. În lotul de hamsteri, au fost găsite 288 de proteine cu expresie semnificativ alterată de stresul hiperlipidemic și tratamentul cu statină. Acestea au fost implicate în *Joncțiuni Aderente* și *Fosforilarea Oxidativă*. În mod interesant, hiperlipidemia a acționat asupra a 120 de proteine atât în lotul de șoareci cât și în cel de hamsteri. Acestea au fost implicate în *Migrarea transendotelială leucocitară*, *Joncțiuni Strânse*, *Fosforilarea Oxidativă* și *Calea Fagozomală*.

Astfel, se poate concluziona că moleculele și căile de semnalizare identificate cu mare confidență și semnificație statistică pot reprezenta noi direcții de studiu a implicațiilor extraordinare pe care hiperlipidemia le demonstrează în funcționalitatea țesuturilor si organelor.

Bibliografie:

1. Antohe F, Heltianu C, Simionescu M. 1991. Albumin binding proteins of endothelial cells: immunocytochemical detection of the 18kDa peptide. Eur. J. Cell Biol., 56, 34-42.
2. Bechara C, Chai H, Lin PH, Yao Q, Chen C., 2007. Growth related oncogene-alpha (GRO-alpha): roles in atherosclerosis, angiogenesis and other inflammatory conditions. Med Sci Monit 13:RA87-90.
3. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L., 2003. Adhesion molecules and atherosclerosis. Atherosclerosis 170:191-203.
4. Engelman DM. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. Nature 438: 578–580.
5. Hamacher J, Lucas R, Lijnen HR, Buschke S, Dunant Y, Wendel A, et al., 2002. Tumor necrosis factor-alpha and angiostatin are mediators of endothelial cytotoxicity in bronchoalveolar lavages of patients with acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med 166:651-6.
6. Hancock JF. 2006. Lipid rafts: Contentious only from simplistic standpoints. Nat Rev Mol Cell Biol 7: 456–462.
7. Haraba R, Suica VI, Uyy E, Ivan L, Antohe F., 2011. Hyperlipidemia stimulates the extracellular release of the nuclear high mobility group box 1 protein. Cell Tissue Res 346:361-8.
8. Jacobson K, Mouritsen OG, Anderson RGW. 2007. Lipid rafts: At a crossroad between cell biology and physics. Nat Cell Biol 9: 7–14.
9. Klausner, R.D., Kleinfeld, A.M., Hoover, R.L. and Karnovsky, M.J. 1980. Lipid domains in membranes. Evidence derived from structural perturbations induced by free fatty acids and lifetime heterogeneity analysis. J. Biol. Chem. 255, 1286–1295
10. Lang JD, McArdle PJ, O'Reilly PJ, Matalon S., 2002. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. Chest 122:314S-20S.
11. Lucas R, Lou J, Morel DR, Ricou B, Suter PM, Grau GE., 1997. TNF receptors in the microvascular pathology of acute respiratory distress syndrome and cerebral malaria. J Leukoc Biol 61:551-8.
12. Lucas R., 2008. Recent advances on the role of the endothelium in pulmonary function and disease. Vascul Pharmacol 49:111-2.
13. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J et al., 2003. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for a new definitions and risk assessement strategies: part I. Circulation 108:1664–1672
14. Nistor A, Simionescu M., 1986. Uptake of low density lipoproteins by the hamster lung. Interactions with capillary endothelium. Am Rev Respir Dis.; 134(6):1266-72.
15. Oh, P., Borgstrom, P., Witkiewicz, H., Li, Y., Borgstrom, B.J., Chrastina, A., et al., 2007. Live dynamic imaging of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung. Nat. Biotechnol. 25, 327–337.
16. Osto E, Coppolino G, Volpe M, Cosentino F., 2007. Restoring the dysfunctional endothelium. Curr Pharm Des 13:1053-68.
17. Palade GE, Simionescu M, Simionescu N., 1981. Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. Biorrheology, 17, 563-568, 1981.
18. Pavlides S, Gutierrez-Pajares JL, Iturrieta J, Lisanti MP, Frank PG., 2014. Endothelial caveolin-1 plays a major role in the development of atherosclerosis. Cell Tissue Res 356:147-57
19. Pike, L.J. 2003. Lipid rafts: bringing order to chaos. J. Lipid Res. 44, 655–667
20. Predescu D, Simionescu N, Simionescu M, Palade GE. 1988. Binding and transcytosis of glycoalbumin by the microvascular endothelium of the murine myocardium. Evidence that the glycoalbumin behaves as a bifunctional ligand. J. Cell Biol., 107, 1729-1738.
21. Russell JA., 2003. Genetics of coagulation factors in acute lung injury. Crit Care Med 31:S243-7.
22. Sargiacomo M, Sudol M, Tang ZL, Lisanti MP., 1993. Signal transducing molecules and GPI-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. J Cell Biol 122:789–807
23. Seljeflot I, Tonstad S, Hjermann I, Arnesen H., 2002. Improved fibrinolysis after 1-year treatment with HMG CoA reductase inhibitors in patients with coronary heart disease. Thromb Res 105:285-90.
24. Sellers MM, Stallone JN., 2008. Sympathy for the devil: the role of thromboxane in the regulation of vascular tone and blood pressure. Am J Physiol Heart Circ Physiol 294:H1978-86.

25. Simionescu M, Antohe F., 2006. Functional ultrastructure of the vascular endothelium—changes in various pathologies. In: Moncada S, Higgs A (eds) Handbook of physiology and bichemistry, vol 176/I. Springer, Berlin, pp 41–69
26. Simionescu N, Simionescu M, Palade GE., 1981. Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. I. Preferential distribution of anionic sites. J. Cell Biol., 90, 605-613.
27. Simons K, Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. Nature 387: 569–572.
28. Singer, S.J. and Nicolson, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175, 720–731
29. Sud N, Sharma S, Wiseman DA, Harmon C, Kumar S, Venema RC, et al., 2007. Nitric oxide and superoxide generation from endothelial NOS: modulation by HSP90. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 293:L1444-53.
30. Uyy E, Ivan L, Boteanu RM, Suica VI, Antohe F., 2013. High-fat diet alters protein composition of detergent-resistant membrane microdomains. Cell Tissue Res 354:771-81.
31. van Meer, G. and Simons, K. 1983. An efficient method for introducing defined lipids into the plasma membrane of mammalian cells. J. Cell Biol. 97, 1365–1374
32. Vasile E, Simionescu M, Simionescu N., 1983. Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low-density lipoprotein in the arterial endothelium in situ. J Cell Biol. Jun;96(6):1677-89.

ACADEMIA ROMÂNĂ
Şcoala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie și Patologie Celulară
„Nicolae Simionescu”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

IDENTIFICAREA DE NOI BIOMARKERI CU POTENȚIAL PREDICTIV PENTRU RISCUL APARIȚIEI EVENIMENTELOR CRITICE LA PACIENȚII CU DETERMINĂRI VASCULARE MULTIPLE

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT
Acad. ANCA VOLUMNIA SIMA

DOCTORAND:
ORIANA ELENA MORARU

2022

Cuprins

Cuvânt înainte

Listă abrevieri

Introducere si obiectivele generale ale tezei

I. Stadiul actual al cunoștințelor

I.1. Sistemul cardiovascular în condiții fiziologice și patologice

I.1.1. Structura peretelui arterial în condiții fiziologice

I.1.2. Ateroscleroza – definiție si factori de risc

I.1.3. Etapele dezvoltării plăcii de aterom

I.1.4. Lipoproteinele, dislipidemia, stresul oxidativ și inflamator în ateroscleroză

I.1.5. Factori epigenetici (microARN) în ateroscleroză

I.2. Teritoriile vasculare afectate de ateroscleroză în boala cardiovasculară

I.3. Boala ocluzivă cerebrovasculară extracraniană

I.3.1. Localizarea plăcii de aterom la nivel carotidian, clasificare și factori de risc

I.3.2. Simptomatologie și diagnostic în boala ocluzivă cerebrovasculară extracraniană

I.3.3. Tratamentul stenozei arterei carotide

I.4. Boala arterială periferică

I.4.1. Clasificarea bolii arteriale a membrelor inferioare

I.4.2. Metode de diagnostic în boala arterială periferică

I.4.3. Tipuri de tratament pentru boala arterială periferică

II. Contribuții originale

II.1. Identificarea unor parametrii biochimici si epigenetici cu potențial de markeri ai gravității stenozei arterei carotide (SAC)

II.1.1. Înrolarea pacienților cu SAC selectați conform ghidurilor profesionale

II.1.2. Caracteristicile antropometrice, diagnosticul secundar și tratamentul medicamentos al pacienților cu SAC

II.1.3 Recoltarea probelor de sânge de la pacienții cu SAC

II.1.4. Procedura de endarterectomie carotidiană (EAC) și recoltarea specimenelor de placă aterosclerotică

II.1.5. Metode biochimice și imunochimice pentru caracterizarea proteinelor plasmatice la pacienții cu SAC

II.1.6. Metode de biologie moleculară pentru analiza factorilor epigenetici (microARN) în probele de plasmă și placa aterosclerotică de la pacienții cu SAC

II.1.7. Metodologia analizei statistice a rezultatelor de la pacienții cu SAC

II.1.8. Parametrii biochimici determinați în plasma pacienților SAC

II.1.9. Caracterizarea tipurilor de plăci de aterom carotidian izolate de la pacienții cu SAC

II.1.10. Identificarea și analiza microARN din plasmă și aterom carotidian de la pacienții cu SAC

II.1.11. Discuții și concluzii parțiale

II.2. Identificarea unor parametrii biochimici și epigenetici cu potențial de markeri ai gravității bolii arteriale periferice (BAP)

II.2.1. Înrolarea pacienților cu BAP selectați conform ghidurilor profesionale

II.2.2. Caracteristicile antropometrice, diagnosticul secundar și tratamentul medicamentos al pacienților cu BAP

II.2.3. Recoltarea probelor de sânge de la pacienții cu BAP

II.2.4. Procedura de revascularizare prin by-pass a arterelor membrelor inferioare la pacienții cu BAP și recoltarea specimenelor de placă aterosclerotică

II.2.5. Metode biochimice și imunochimice pentru caracterizarea proteinelor și lipoproteinelor plasmatice la pacienții cu BAP

II.2. 6. Metode de biologie moleculară pentru identificarea și analiza microARN în probele de plasmă și placă de aterom de la pacienții cu BAP

II.2.7. Metodologia analizei statistice a rezultatelor de la pacienții cu BAP

II.2.8. Parametrii biochimici determinați în plasma pacienților cu BAP

II.2.9. Proteine modificate (oxidate si/sau glicate) în lipoproteine de densitate înaltă (HDL) de la pacienții cu BAP, cu și fără diabet

II.2.10. Caracterizarea tipurilor de plăci de aterom din arterele periferice de la pacienții cu BAP

II.2.11. Analiza factorilor biochimici și microARN de la pacienții cu BAP în funcție de evenimentele cardiovasculare înregistrate pe parcursul unui an de urmărire clinică

II.2.12. Discuții și concluzii parțiale

III. Concluzii generale

IV. Bibliografie

Lucrări publicate pe durata programului doctoral

Cuvinte cheie: ateroscleroză, boala arterelor periferice, markeri de inflamație, markeri epigenetici (microARN), lipoproteine, stenoza arterelor carotide

Număr total de pagini: 130

Număr de figuri în Stadiul actual al cunoștințelor: 12

Număr de tabele în Stadiul actual al cunoștințelor: 5

Număr de figuri în Contribuții originale: 22

Număr de tabele în Contribuții originale: 26

Referințe bibliografice: 197

Lucrări publicate în reviste indexate ISI: 3 (1 – autor principal, 2 – co-autor)

Introducere și obiectivele generale ale tezei

Elaborarea prezentei teze a pornit de la marea problematică a medicinei moderne, și anume ateroscleroza, și mai exact de la totalitatea și severitatea determinărilor aterosclerotice la nivel vascular periferic (carotidian și la nivelul membrelor inferioare). Severitatea bolii aterosclerotice la nivel periferic, și nu numai, este influențată de prezența factorilor de risc (diabetul zaharat, dislipidemia, fumatul, vârsta, asocierea altor determinări aterosclerotice, obezitatea) și de complexitatea acestora. Evoluția bolii aterosclerotice este galopantă în absența corecției acestor factori de risc sau a neglijării medicației sau a stilului de viață nesănătos. Această teză de doctorat și-a propus să găsească corelații între parametrii plasmatici lipidici și inflamatori și boala aterosclerotică, precum și identificarea unor markeri ai evoluției bolii aterosclerotice. Persistența factorilor de risc în zonele arteriale pro-aterogene determină apariția și progresia unei cascade de evenimente ce se traduce prin apariția și progresia plăcii de aterom. Etapele formării plăcii de aterom încep cu acumularea subendotelială a lipoproteinelor modificate oxidativ, care declanșează activarea celulelor endoteliale (CE), urmată de disfuncția endotelială, cu apariția unor molecule de adeziune celulară responsabile de declanșarea unui puternic răspuns inflamator. Celulele inflamatorii pătrunse sub endoteliu, prin factorii pe care îi secretă, determină acumularea de celule musculare netede la nivelul intimei arteriale, cu formarea capului fibros. Celulele musculare netede suferă și ele un process de transformare, într-un fenotip secretor, dând naștere unei lamine bazale hiperplazice, multistratificate, cu o matrice extracelulară bogată în fibre de colagen și fibrile (Simionescu and Sima, 2012). În final, se formează placa de aterom, care poate fi stabilă sau instabilă, în funcție de compoziția celulară a acesteia. Eroziunea sau subțierea capului fibros expune matricea extracelulară subendotelială bogată în celule proinflamatorii și procoagulante, celulelor din circulația sanguină, inițiindu-se astfel procesul de tromboză. Această cascadă de evenimente este amplificată și accelerată în cazul diabetului zaharat, începând cu apariția timpurie a disfuncției endoteliale (Toma et al 2021), a plăcii aterosclerotice și trombozarea acesteia.

Structura tezei de doctorat

În **prima parte** a tezei de doctorat am abordat problematica pacientului „vascular”, adică a pacientului care asociază una sau mai multe determinări aterosclerotice, de obicei cu multipli factori de risc asociați și neglijați, în proporție ridicată. Pacientul ajunge la chirurgul vascular deoarece nu mai suportă durerea de repaus sau nocturnă, sau când leziunea trofică de la nivelul piciorului capătă un miros fetid pe care pacientul sau familia nu îl mai poate suporta, sau când leziunile vasculare de la nivelul arterelor carotide se soldează cu un accident vascular și atunci este nevoie de un examen de specialitate. De asemenea, am descris pe scurt modalitatea de formare a plăcii de aterom și mecanismele și moleculele implicate în acest proces aterosclerotic.

Partea a doua a lucrării, cea de contribuții originale cuprinde:

- criteriile de înrolare a pacienților și descrierea tipurilor de intervenții chirurgicale aplicate pacienților înrolați în studiu;
- metodele biochimice și imunochimice pentru caracterizarea proteinelor și lipoproteinelor plasmatice și metodele de biologie moleculară pentru analiza factorilor epigenetici (microARN) în probe de plasmă și aterom;
- identificarea unor parametrii biochimici si epigenetici cu potențial de markeri ai gravității bolii stenotice carotidiene și ai bolii arteriale periferice în două studii specifice.

Am stabilit grupele de pacienți cu stenoză carotidiană și boală arterială periferică, grupul control pentru fiecare din cele două categorii de pacienți, datele antropometrice, diagnosticele secundare, tratamentul medicamentos al acestor categorii de pacienți. Am studiat două teritorii vasculare (arterele carotide și arterele periferice ale membrelor inferioare) a căror afectare aterosclerotică este frecventă și produce morbiditate și mortalitate în cel mai înalt grad.

În **primul studiu**, ne-am propus să evaluăm rolul miR-223, ca potențial biomarker pentru agravarea SAC la pacienții cu vârsta peste 65 de ani și am corelat nivelele acestuia cu parametrii asociați lipoproteinelor de densitate înaltă (HDL). Concluzia acestui studiu este că pacienții cu SAC cu vârsta peste 65 de ani au prezentat o creștere semnificativă a nivelurilor miR-223-3p atât în plasmă, cât și în placa de aterom carotidiană, comparativ cu pacienții cu SAC sub 65 de ani.

În cel de **al doilea studiu**, ne-am propus să identificăm modificări ale compoziției subfracțiilor HDL_2 și HDL_3 care se asociază cu severitatea bolii arteriale periferice (BAP)

și determină alterarea funcției HDL măsurată ca efecte antiinflamatorii exercitate asupra CE umane activate cu factorul de necroză tumorală alfa (TNFα). Am urmărit să determinăm care dintre modificările identificate la nivelul constituenților HDL sunt detectabile la proteine din plasmă și ar putea prezice severitatea bolii la pacienții cu BAP, pentru a fi transpuse în laboratoarele clinice. Astfel am constatat creșterea nivelurilor de clusterina (CLU) și a activității specifice ale mieloperoxidazei (MPO) și diminuarea activității specifice a paraoxonazei (PON1) în plasmă, acestea reflectând alterarea proteinelor HDL și a funcționalității acestora. Rezultatele ar putea fi translatate în laboratoare clinice și ar putea servi la prognosticul severității BAP. De asemenea, în același studiu am analizat expresia din placa aterosclerotică și de la nivel plasmatic al hsa-miR-142-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-92a-3p și am realizat corelații cu evoluția postoperatorie pe parcursul unui an a pacienților cu BAP. Am dovedit pentru prima dată legătura dintre nivelurile miARNs din placa aterosclerotică și expresia pri-miARNs corespunzătoare în placa aterosclerotică.

I. Stadiul actual al cunoștințelor

În acest capitol am cuprins date cunoscute despre structura peretelui arterial în condiții fiziologice (tipurile de artere și structura peretelui vascular normal), ce se întâmplă în condiții patologice, cum apare ateroscleroza, fazele de apariție și dezvoltare a plăcii de aterom, precum și despre factorii de risc bine cunoscuți care determină procesul aterosclerotic. De asemenea, am prezentat date despre rolul factorilor epigenetici (microARN) în ateroscleroză.

Boala cardiovasculară (BCV), principala cauză de mortalitate în lume, este un proces complex, principalele manifestări clinice incluzând infarctul miocardic, accidentul vascular cerebral și BAP, care pot fi unice ca localizare sau cu determinări simultane la două sau trei niveluri arteriale. Procesul aterosclerotic este cel care generează BCV. Placa aterosclerotică este rezultatul acțiunii unor factori de risc, considerați ca fiind clasici (dislipidemia, stresul oxidativ, citokinele proinflamatorii, factori vasoconstrictori incriminati în hipertensiune, produși de glicooxidare asociaţi cu hiperglicemia și fumatul) sau în absența unei hipercolesterolemii sistemice, inițierea formării plăcii de aterom este o reacție inflamatorie.

Evaluarea riscului cardiovascular individual implică măsurarea factorilor de risc corelați cu riscul cardiovascular (lipidele, glicemia, vârsta, sexul, fumatul și tensiunea arterială). La acești factori clasici se încearcă stabilirea unor corelații între markerii plasmatici și boala aterosclerotică, precum și predictibilitatea evoluției bolii aterosclerotice. Este cunoscut faptul că boala vasculară afectează arterele la diferite niveluri și se caracterizează prin efecte dăunătoare la nivelul endoteliului vascular, generând disfuncție endotelială. Disfuncția endotelială este răspunsul la acțiunea factorilor de risc cardiovascular. Ea reprezintă etapa timpurie cheie în dezvoltarea aterosclerozei, dar apoi este implicată în toate etapele progresiei plăcii aterosclerotice și în apariția complicațiilor acesteia. Indiferent de factorii care o generează, formarea plăcii de aterom este un proces în care implicarea graduală a diferitelor tipuri de celule și a produșilor lor secretorii duce la o serie de secvențe de la formarea stratului lipidic la placa fibrolipidică, la ruptură si aterotromboză.

Ateroscleroza este un proces multifactorial indus și favorizat de factori de risc precum dislipidemia, stresul oxidativ și inflamator, diabetul zaharat (DZ), hipertensiunea, fumatul, îmbătrânirea și mutațiile genetice (Authors/Task Force et al., 2019) și poate fi localizat la mai multe niveluri, concomitent (coronarian, carotidian și la nivelul membrelor inferioare).

Dislipidemia se definește prin concentrații sanguine crescute de colesterol total (total cholesterol, TC) și de LDL-colesterol (LDL-C) și/sau trigliceride (TG) și scăderea colesterolului în HDL (Musunuru, 2010).

HDL sunt complexe macromoleculare alcătuite din lipide și proteine, produse în ficat și intestinul subţire, care transportă colesterol liber și esterificat, fosfolipide (phospholipids, PL), TG și apoproteine (apolipoproteine - apoAI, apoAII, apoCIII, apoE, enzime – paraoxonaza 1 (PON1), mieloperoxidaza (MPO)) în circulaţie (Camont et al., 2011, Larach et al., 2012). În plasma umană, HDL sunt reprezentate de două subfracţii majore: HDL_2 si HDL_3, cu dimensiune, densitate și compoziţie diferită (Eren et al., 2012). HDL au proprietăți anti-aterosclerotice datorită capacității lor de a prelua colesterolul în exces din țesuturile periferice transportându-l la ficat, așa-numitul revers cholesterol transport (RCT), dar și datorită potențialului lor anti-oxidant, anti-inflamator și anti-trombotic (Arora et al., 2016). Un efect atero-protector al HDL este conservarea funcției CE (). În ultimii ani, calitatea și funcția HDL au devenit un indicator consecvent al riscului de BCV (Carnuta et al., 2017, Parhofer, 2015). În cazul creșterii stresului oxidativ, HDL devine disfuncțional și prezintă un număr crescut de molecule de MPO care înlocuiesc

moleculele de PON1 (Variji et al., 2019). Astfel, HDL disfuncțional nu mai poate proteja LDL de oxidare, aceste modificări fiind factorii cheie de risc pentru inițierea și progresia plăcilor aterosclerotice. Activitatea PON1 în ser și în HDL la pacienții cu BAP este scăzută comparativ cu subiecții sănătoși, concluzia fiind că HDL se oxidează și devine disfuncțional (Tan et al., 2014, Shen et al., 2015, Luscher et al., 2014). Încercările pentru dezvoltarea de noi terapii pentru tratamentul pacienților cu BAC bazate pe stimularea ficatului și intestinului subțire de a produce HDL funcțional sunt de mare actualitate.

MicroARN-urile (miARN) sunt secvențe scurte, necodante de ARN, de 20-25 nucleotide, implicate în controlul expresiei genice. Aceste miARN orchestrează expresia genelor la nivel post-transcriptional, reglând sinteza proteinelor la nivelul ARN-ului mesager (ARNm) prin degradarea acestuia. Astfel, fiecare miARN poate deveni un factor de transcriere și un reglator al expresiei genice cu implicații în proliferarea și diferențierea celulară, apoptoză și procese inflamatorii (Vogiatzi et al., 2018). Aceste miARN sunt descrise ca reglatori în variate procese celulare întâlnite în fiziopatologia BCV (Vogiatzi et al., 2018), a cancerului (Rupaimoole and Slack, 2017), bolilor autoimune (Yan et al., 2019) și a altor afecțiuni. Mai mult, miARN se găsesc în diferite țesuturi și celule sanguine, nivelul lor plasmatic fiind propus ca un potențial biomarker în diagnosticul evenimentelor cardiovasculare, cum ar fi infarctul miocardic (Devaux et al., 2012). Există câteva date despre nivelul miARN în placa aterosclerotică (Parahuleva et al., 2018), dar nu au fost raportate studii cu privire la corelația nivelului expresiei miARN din placă și cel de la nivel plasmatic, precum și corespondentul expresiei pri-miARN în placă.

Evenimentul vascular major în stenoza arterei carotide (SAC) este reprezentat de accidentul vascular ischemic, iar dezvoltarea leziunilor la nivelul arterelor membrelor inferioare generează BAP, cu repercusiuni importante asupra calității vieții pacientului și reintegrarea lui în societate.

Ateroscleroza arterelor carotide extracraniene reprezintă o problemă majoră de sănătate, cu o mortalitate prin accident vascular ischemic situată între 10-30%. Semnele și simptomele în boala ocluzivă cerebrovasculară extracraniană sunt reprezentate de amauroza fugace, accidentul ischemic tranzitor, accidentul ischemic în evoluție și infarctul cerebral. Explorările imagistice care stabilesc diagnosticul și conduita terapeutică sunt ecografia Doppler, angio tomografia sau angio RMN, angiografia carotidiană.

Tratamentul bolii ocluzive cerebrovasculare extracraniene presupune mai multe abordări şi anume: schimbarea stilului de viaţă, tratamentul medicamentos şi, după caz, tratamentul chirurgical. Endarterectomia carotidiană (EAC) se adresează pacienților cu

SAC simptomatică, dar și unui grup de pacienți asimptomatici cu risc crescut de eveniment vascular cerebral (conform ghidurilor internaționale).

Ateroscleroza arterelor periferice a membrelor inferioare reprezintă un procent mic al mortalității globale de cauze cardiovasculare, cca 1-2%, dar reprezintă o cauză comună de morbiditate generată de reducerea mobilității, prin claudicație intermitentă, durere de repaus sau ischemie acută. BAP a membrelor inferioare poate fi simptomatică sau asimptomatică, localizată la diverse niveluri ale axului arterial periferic (artere femurale comune, profunde, superficiale, poplitee și trunchiuri gambiere) și poate determina manifestări clinice diverse, de la durere de tip claudicație intermitentă, cu reducerea progresivă a perimetrului de mers pană la durere de repaus (care nu lasă pacientul să se odihnească și care necesită de obicei folosirea unei cantități importante de opiacee) și apariția leziunilor trofice minime sau extensive de tipul gangrenei. Implicații importante în evoluția pacienților cu BAP o are și asocierea diabetului (Abou-Zamzam et al., 2007)

Diagnosticul BAP se face prin efectuarea unei anamneze minuțioase, examinarea clinică a pacientului cu aprecierea pulsurilor periferice, măsurarea indicelui gleznă-braț, efectuarea unei ecografii Doppler și a angiografiei de membre inferioare sau a unui angio CT/RMN.

Tratamentul BAP implică controlul factorilor de risc (tratamentul conservator) și tratamentul chirurgical, acesta din urmă putând fi de revascularizare (by-pass, angioplastie) sau de amputaţie.

II. Contribuții originale

Acest capitol cuprinde:

II.1. Identificarea unor parametrii biochimici și epigenetici cu potențial de markeri ai gravității stenozei arterei carotide (SAC).

II.2. Identificarea unor parametrii biochimici și epigenetici cu potențial de markeri ai gravității bolii arteriale periferice (BAP).

Identificarea unor parametrii biochimici și epigenetici cu potențial de markeri ai gravității stenozei arterei carotide (SAC) a avut ca scop evaluarea asocierii hsa-miR-223-3p (miR-223) cu vârsta la pacienții cu SAC după intervenția chirurgicală de EAC, adică estimarea rolului miR-223 ca potențial biomarker pentru agravarea SAC la pacienții cu vârsta peste 65 de ani și asocierea acestuia cu parametrii asociați HDL.

Studiul a cuprins 32 de pacienți cu SAC > 70% internați în spital pentru procedura de EAC și 28 de subiecți sănătoși control (N). Cei 32 de pacienți cu SAC, internați în spital pentru procedura de EAC, au fost împărțiți în 2 grupe, în funcție de vârstă: pacienți cu SAC cu vârsta sub 65 de ani (n = 13) și pacienți cu SAC cu vârsta peste 65 de ani (n = 19). Am selecționat pacienții în funcție de criteriile de includere și excludere pe care le-am stabilit înainte de începerea studiilor, iar intervențiile chirurgicale au respectat recomandările societăților de profil.

Au fost determinați parametrii plasmatici și au fost caracterizate proteinele plasmatice la pacienții cu (SAC (Figura 1) prin metode specifice și de asemenea s-a efectuat analiza Western blot a probelor de la pacienții cu SAC.

Am procesat specimenele de plăci aterosclerotice carotidiene pentru microscopie optică și am aplicat metode de biologie moleculară pentru analiza factorilor epigenetici (microARN) în probele de plasmă și placa aterosclerotică de la pacienții cu SAC, apoi am analizat statistic rezultatele miARN de la pacienții cu stenoza arterei carotide (SAC).

Din totalul pacienților cu SAC care au suferit intervenție chirurgicală pentru îndepărtarea plăcii carotidiene, un procent de 66,7% au prezentat o evoluție bună și 33,3% au avut o evoluție nefavorabilă. Pacienții cu SAC cu evoluție nefavorabilă a bolii au prezentat o creștere a concentrației plasmatice a TG, CRP, formei oxidate a ApoAI (MDA-ApoAI) și acidului sialic, față de cei cu evoluție favorabilă (Figura 1).

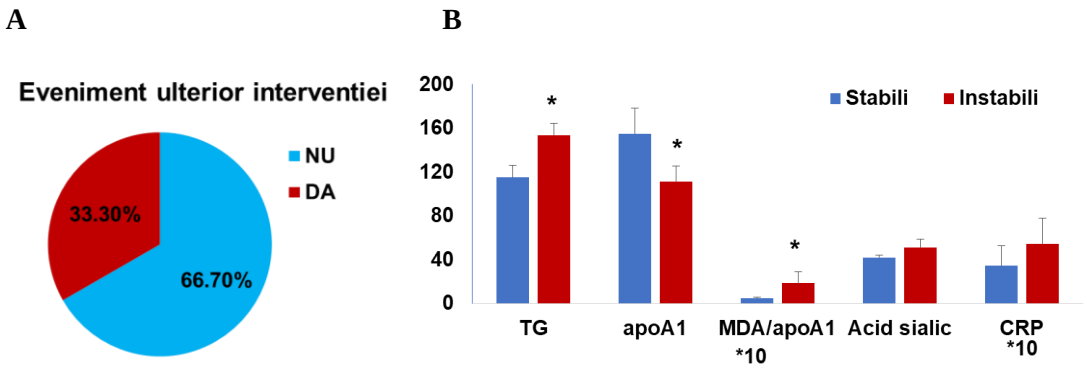


Figura 1. Corelații între evoluția pacienților cu stenoza arterelor carotide la 1 an de la intervenție (A) și parametrii plasmatici determinați inițial (B). Datele sunt exprimate ca medii ± eroare standard a mediei (SEM). *p < 0,05 SAC stabili vs. instabili.

Noutatea studiului nostru este că pacienții cu SAC cu vârsta peste 65 de ani comparativ cu pacienții cu SAC sub 65 de ani au prezentat o creștere semnificativă a nivelurilor miR-223-3p atât în plasmă, cât și în placa de aterom carotidiană (Figura 2).

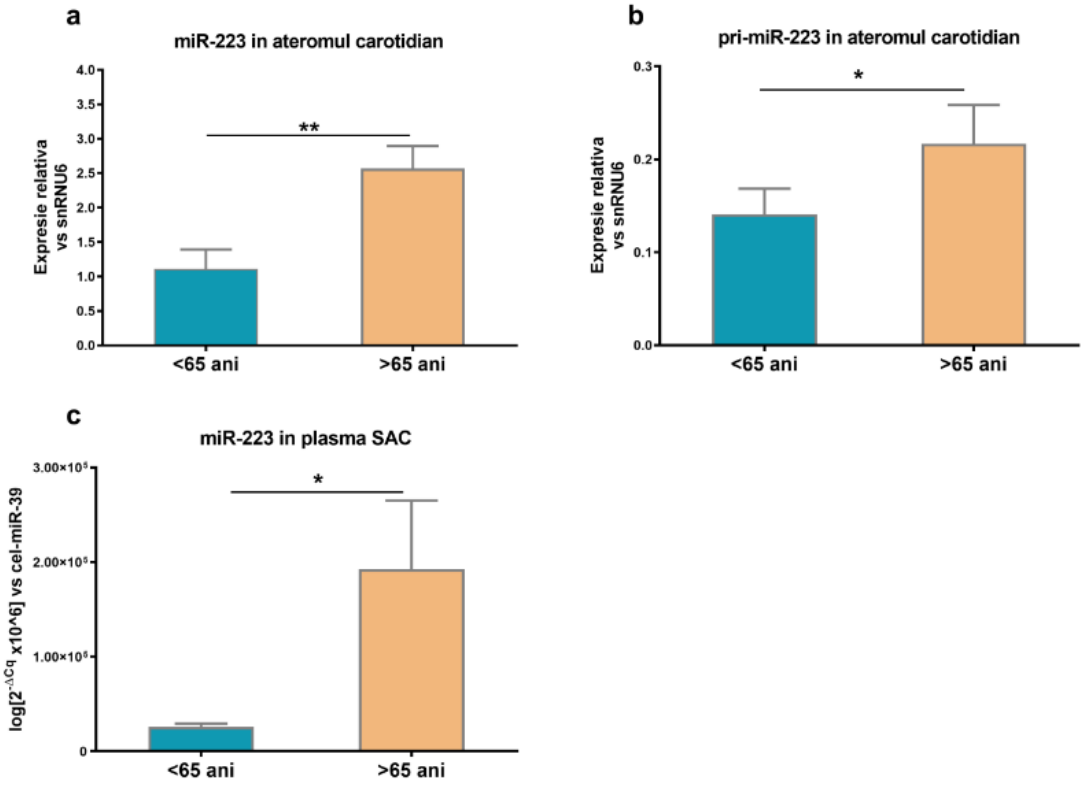


Figura 2. **Nivelurile miR-223-3p la pacienții cu SAC.** Niveluri de miR-223-3p (a) și pri-miR-223 (b) în ateromul carotidian și de miR-223-3p în plasmă (c) la pacienții cu SAC cu vârsta peste 65 de ani comparativ cu cei sub 65 de ani. Datele sunt ilustrate sub formă de histograme cu bare de eroare SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparativ cu grupul < 65 ani.

Din câte știm, acesta este primul studiu care raportează corelația nivelurilor miR-223-3p în plasmă și placa de aterom carotidiană cu vârsta pacienților cu SAC.

Am demonstrat în acest capitol o producție sporită de miR-223-3p, local și specific în celulele ateromului carotidian de la pacienții vârstnici cu SAC, asociată cu expresia crescută local a pri-miR-223, aceste date corelându-se cu observațiile grupului lui Li (Li et al., 2017) care susțin ipoteza că la pacienții vârstnici cu SAC, o producție sporită de miR-223 apare în plăcile aterosclerotice ca răspuns la diferiți factori oxidativi și inflamatori ce ar putea afecta activitatea promotorului miR-223.

Împreună, datele noastre și ale celorlalte grupuri sugerează că:

1. nivelurile crescute de miR-223-3p plasmatice observate la pacienții vârstnici cu SAC se corelează cu producția locală crescută de miRNA în ateromul carotidian,
2. nivelurile crescute de miR-223-3p se corelează cu procesele oxidative și inflamatorii care apar în timpul îmbătrânirii,
3. modularea expresiei miR-223-3p ar putea fi utilizată ca o posibilă abordare terapeutică pentru prevenirea restenozei după endarterectomie la pacienții cu SAC.

O limitare a prezentului studiu este numărul relativ mic de pacienți cu SAC analizați. În ciuda acestui fapt, analizele statistice utilizate, împreună cu distribuția miR-223 în plasmă și aterom carotidian, au dat rezultate statistic semnificative. O altă limitare al studiului nostru și al altora privind analiza miARN este lipsa metodelor standardizate de măsurare a nivelurilor absolute de miARN în plasmă, ceea ce face compararea cu alte date din literatură destul de dificilă.

Cel de al doilea studiu s-a ocupat de identificarea unor parametrii biochimici și epigenetici cu potențial de markeri ai gravității bolii arteriale periferice (BAP).

În studiul acesta, ne-am propus să identificăm modificări ale compoziției subfracțiilor HDL_2 și HDL_3 care se asociază cu severitatea BAP și determină alterarea funcției HDL măsurată ca efect anti-inflamator exercitat asupra CE umane activate cu TNFα. Un alt scop al studiului a fost de a determina care dintre modificările identificate la nivelul constituenților HDL sunt detectabile în plasmă și ar putea prezice severitatea bolii la pacienții cu BAP, pentru a fi transpuse în laboratoarele clinice.

Am analizat nivelurile unui set de 4 miARN-uri (hsa-miR-142-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-92a-3p) în plasma și în plăcile aterosclerotice femurale la pacienții cu BAP, care au dezvoltat evenimente cardiovasculare în decursul unui an de la intervenția chirurgicală primară. Am ales acest set de miARN pe baza studiilor anterioare din departamentul Lipidomică al IBPC-NS și al altor date publicate in literatură. Astfel, am analizat expresia din placă și de la nivel plasmatic al hsa-miR-142-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-92a-3p și am realizat corelații cu evoluția pacienților cu BAP. Am raportat că hsa-miR-142-3p poate fi considerat un biomarker predictiv pentru evenimentele cardiovasculare.

Studiul a cuprins 47 de pacienți diagnosticați cu BAP (4 femei și 43 de bărbați) BAP, cu vârste cuprinse între 32-83 de ani, cu by-pass la nivelul membrului inferior și 28 de subiecți sănătoși control (N). Am selecționat pacienții în funcție de criteriile de includere și excludere pe care le-am stabilit înainte de începerea studiilor, iar intervențiile chirurgicale au respectat recomandările societăților de profil.

Am determinat parametrii plasmatici, am izolat prin ultracentrifugare subfracțiile de HDL din plasma pacienților cu BAP, am măsurat parametrii biochimici în subfracțiile de HDL, am determinat aducții de proteine MDA și AGE în subfracțiile de HDL, am efectuat analiza Western blot și am analizat miARN în plasma și placa aterosclerotică de la pacienții cu BAP.

Pacienții cu BAP au fost împărțiți în două grupuri în funcție de prezența DZ ca patologie asociată cu BAP: (i) BAP fără DZ (BAP, n = 32) și (ii) BAP cunoscută a avea DZ (BAP-DZ, n = 21. HDL_2 și HDL_3 izolate prin ultracentrifugare din plasma subiecților sănătoși (N) și a pacienților BAP cu și fără DZ (BAP-DZ/BAP) au fost caracterizate prin:

1. conținutul de lipide și apolipoproteine: colesterol, fosfolipide (PL), apolipoproteina AI (ApoAI), ApoAII, ApoCIII, clusterin (CLU), and ApoE,
2. conținutul și activitatea PON1 și MPO: PON1 proteina și activitate, MPO proteina si activitate,
3. prezența aducților AGE-proteine: AGE-ApoAI, AGE-CLU, AGE-ApoE și AGE-PON1,
4. prezența markerilor de stres oxidativ: aducți malondialdehida-ApoAI (MDA-ApoAI), MDA-CLU, MDA-ApoE, MDA-PON1, ceruloplasmina (CP) și diene conjugate.

Rezultatele noi ale studiului nostru sunt că la pacienții cu BAP, DZ induce o alterare diferențiată a componentelor proteice ale HDL_2 și HDL_3, după cum urmează:

1. HDL_2 prezintă o reducere a proteinei PON1 și a activității, împreună cu scăderea apoAI și creșterea apoAII și apoCIII;
2. o creștere modestă a proteinei MPO în HDL_2 este însoțită de o creștere semnificativă a aducților de proteine-MDA și -AGE în ApoAI, CLU, ApoE și PON1;
3. în HDL_3 au crescut CLU și apoCIII și au scăzut nivelurile apoAII;
4. HDL_3 are o activitate PON1 redusă, în paralel cu nivelurile crescute de MPO și CP, și niveluri crescute de MDA- și AGE-PON1, -CLU și AGE-apoAI (Figurile 3-5)

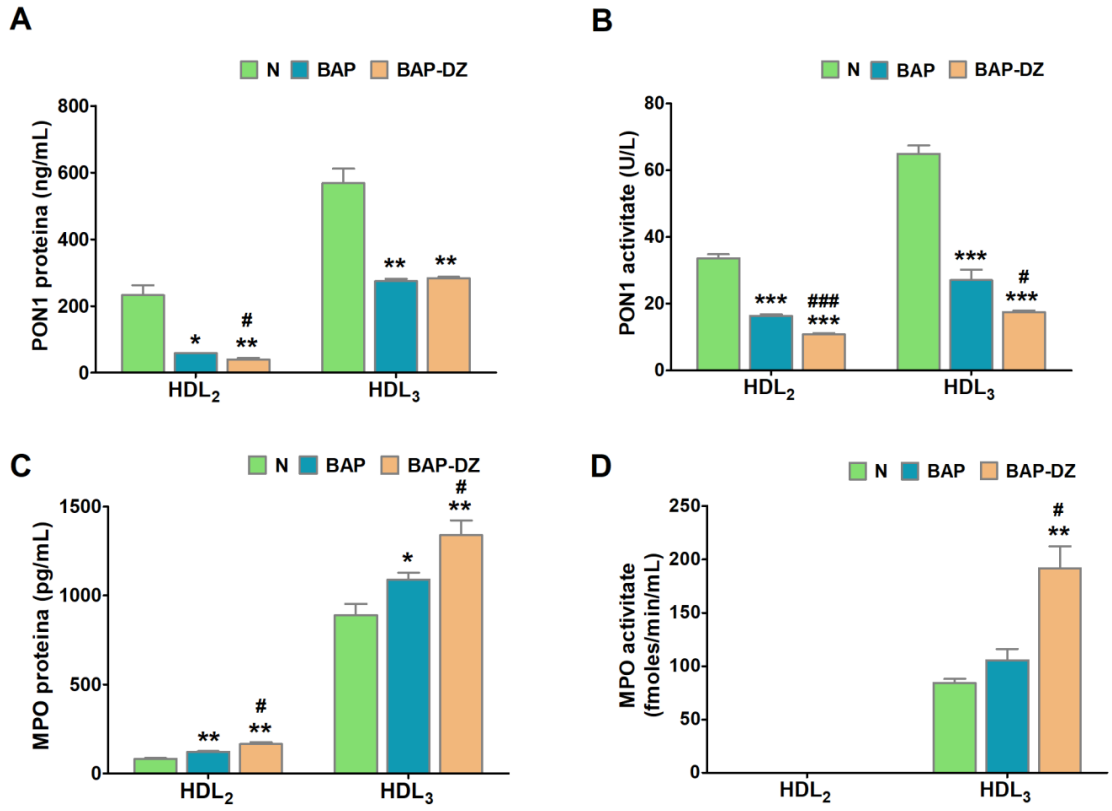


Figura 3. Nivelurile de proteină și activitate ale paraoxonazei 1 (PON1) si ale mieloperoxidazei (MPO) în subfracțiile de HDL. HDL_2 și HDL_3 izolate prin ultracentrifugare din plasma subiecților sănătoși (N) și a pacienților BAP cu și fără DZ (BAP-DZ/BAP) au fost caracterizate din punct de vedere al conținutului și activității PON1 și MPO: PON1 proteina (**A**) si activitate (**B**), MPO proteina (**C**) si activitate (**D**). Datele sunt exprimate ca medie ± SEM; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. N; $^{\#}$p < 0,05, $^{\#\#\#}$p < 0,001 vs. BAP.

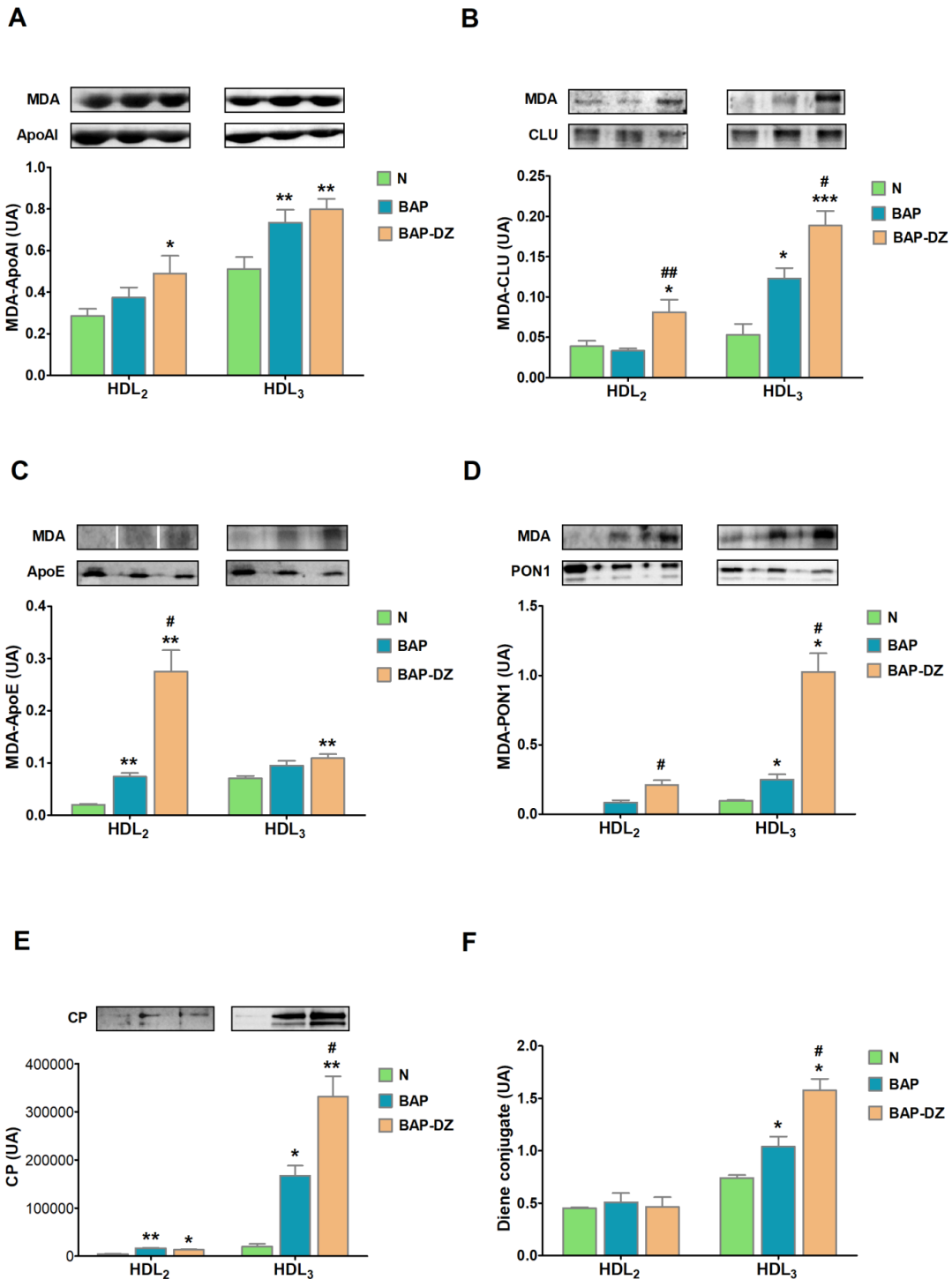


Figura 4. Parametrii de stres oxidativ în subfracțiile de HDL. HDL_2 si HDL_3 izolate prin ultracentrifugare din plasma subiecților sănătoși (N) și a pacienților BAP cu și fără DZ (BAP-DZ/BAP) au fost caracterizate din punct de vedere al prezenței markerilor de stres oxidativ: aducți malondialdehidă-apolipoprotein AI (MDA-ApoAI) (**A**), MDA-clusterina (MDA-CLU) (**B**), MDA-ApoE (**C**), MDA-paraoxonaza 1 (MDA-PON1) (**D**), ceruloplasmina (CP) (**E**) si diene conjugate (**F**). Datele sunt exprimate ca medie ± SEM; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. N; $^{\#}$p < 0,05, $^{\#\#}$p < 0,01 vs. BAP.

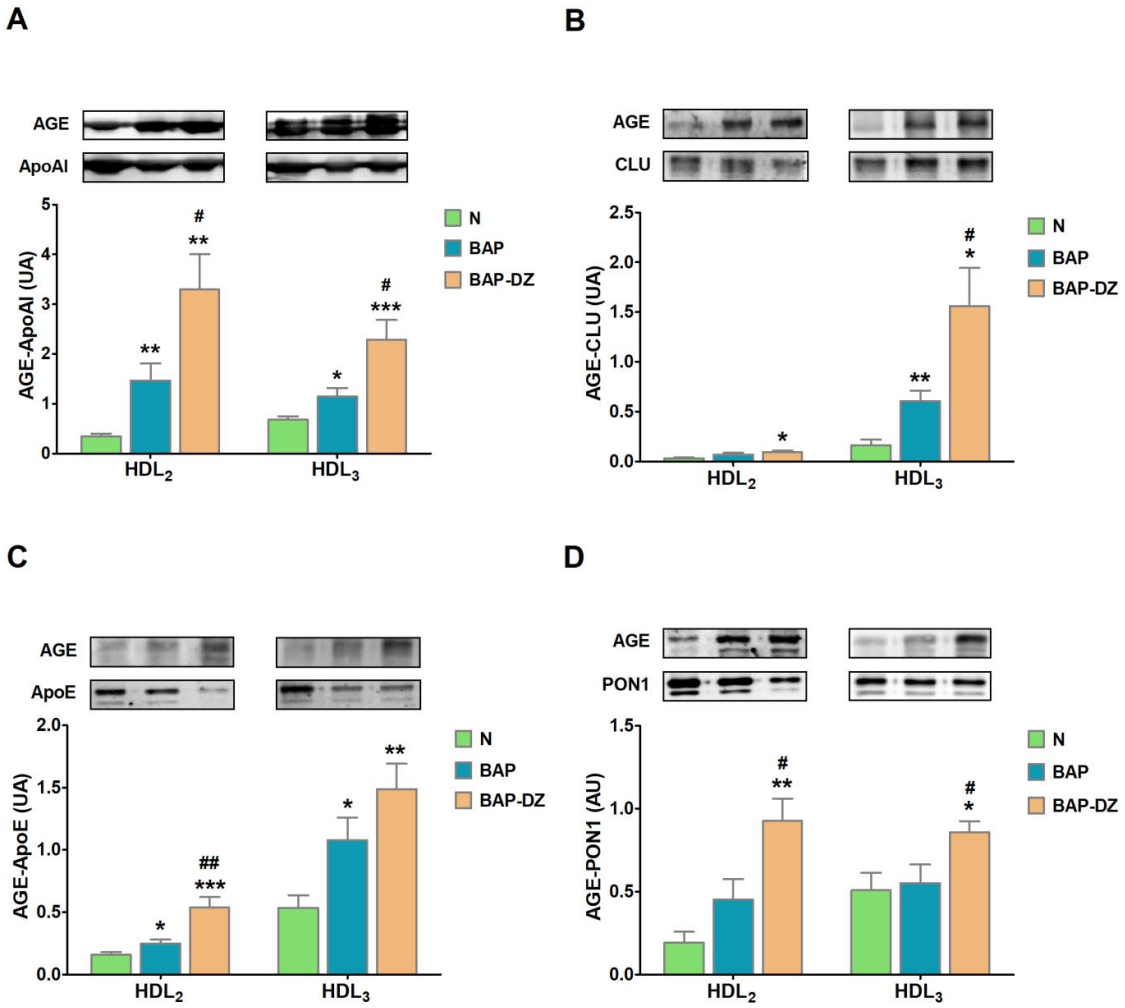


Figura 5. Produșii finali de glicare avansată (AGE) formează aducți cu proteinele din subfracțiile de HDL. HDL_2 și HDL_3 izolate prin ultracentrifugare din plasma subiecților sănătoși (N) și a pacienților BAP cu și fără DZ (BAP-DZ/BAP) au fost caracterizate din punct de vedere al prezenței aducților AGE-proteine: AGE-apolipoproteina AI (AGE-ApoAI) (**A**), AGE-clusterina (AGE-CLU) (**B**), AGE-ApoE (**C**) și AGE-paraoxonaza 1 (AGE-PON1) (**C**). Datele sunt exprimate ca medie ± SEM; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. N; $^{\#}$p < 0,05, $^{\#\#}$p < 0,01 vs. BAP.

În prezentul studiu, arătăm pentru prima dată că subfracțiile de HDL de la pacienții cu BAP și cu DZ au o compoziție distinctă în comparație cu cele de la pacienții cu BAP fără DZ. Astfel, HDL_2 are niveluri mai scăzute de TC și PL în BAP-DZ față de BAP.

O altă noutate a studiului nostru este redistribuirea CLU și apoAII între subfracțiile de HDL în BAP-DZ în comparație cu pacienții cu BAP. Astfel, nivelul CLU este redus în

HDL_2 și crescut în HDL_3, în timp ce nivelul apoAII este crescut în HDL_2 și diminuat în HDL_3 (Maskanakis et al., 2018, Rodriguez-Rivera et al., 2021). Rezultatele noastre arată că, în condiții patologice pronunțate, cum ar fi diabetul, producția de CLU este mai mare la pacienții cu BAP-DZ comparativ cu cei cu BAP, afinitatea sa pentru HDL_3 fiind crescută în comparație cu HDL_2, în acord cu datele publicate anterior (Davidson et al., 2009).

Raportăm aici pentru prima dată că la pacienții cu BAP-DZ versus cei cu BAP, proteina PON1 scade în HDL_2, în timp ce activitatea sa scade în ambele subfracții de HDL, probabil datorită creșterii semnificative a nivelurilor de MPO care dislocuie și oxidează PON1 (în special în HDL_3), contribuind astfel la disfuncția HDL. Anterior, raportul dintre proteinele MPO și PON1 sau dintre activitățile lor au fost propuse ca markeri pentru funcționalitatea HDL (Arora et al., 2016).

Datele noastre arată pentru prima dată că, în condiții diabetice, atașarea CLU la HDL_3 crește, în ciuda diminuării PON1. În plus, CP pro-oxidantă atașată la HDL_3 este crescută considerabil în condițiile diabetice, contribuind astfel la disfuncția HDL, în acord cu rezultatele noastre anterioare (Carnuta et al., 2017).

Astfel, o altă noutate a rezultatelor noastre este că CLU și CP sunt atașate la HDL_3 mai mult la pacienții cu BAP-DZ decât la cei cu BAP, sugerând că în condiții diabetice coexistența lor în HDL_3 este favorizată. Acest dezechilibru între enzimele antioxidante și pro-oxidante asociate cu HDL, în favoarea celor din urmă, generează o creștere semnificativă a modificărilor oxidative ale apolipoproteinelor. Toate aceste modificări sunt reflectate de nivelurile crescute de diene conjugate, MDA- și AGE-apolipoproteine și -PON1, dezvăluind o alterare excesivă a calității HDL la pacienții cu BAP-DZ comparativ cu cei cu BAP. Dintre modificările care apar în componentele HDL în condiții patologice, modificarea MDA-HDL are impactul negativ cel mai puternic asupra RCT (Bornfeldt et al., 2021).

Subliniem rezultatele noi și foarte interesante obținute în studiul nostru și anume că dintre toate componentele HDL_2 și HDL_3 analizate, doar nivelurile CLU, activitățile specifice PON1 și MPO prezintă diferențe semnificative în plasma pacienților cu BAP-DZ față de cei cu BAP și prezintă o puternică asociere predictivă cu diabetul. Numărul mic de pacienți cu BAP-DZ și BAP reprezintă o limitare a studiului nostru; totuși am ajuns la semnificație statistică pentru parametrii propuși ca markeri pentru severitatea BAP.

În **concluzie**, creșterea nivelurilor CLU și a activității specifice MPO și diminuarea activității specifice PON1 în plasmă reflectă alterarea funcționalității HDL. Acestea ar putea fi translatate în laboratoare clinice și ar putea prezice severitatea BAP în stările

hiperglicemice. În plus față de markerii stabiliți măsurați în laboratoarele clinice, acești trei parametri ar putea fi considerați biomarkeri candidați pentru severitatea BAP și utilizați în viitor pentru o predicție mai bună și mai timpurie a evoluției bolii.

Într-un studiu paralel am căutat să identificăm potențialii miARN predictivi pentru apariția evenimentelor cardiovasculare postoperatorii la pacienții cu BAP, măsurând nivelurile plasmatice ale miARN în plasmă și în placa aterosclerotică și am făcut corelații cu evenimentele cardiovasculare apărute pe parcursul unui an de la intervenția chirurgicală. Noile date (Figura 6) arată că spre deosebire de pacienții BAP fără EV, pacienții cu BAP cu EV prezintă:

1. o alterare a parametrilor asociați cu stresul oxidativ și inflamator, corelată cu o creștere semnificativă în plasmă a nivelurilor miR-142-3p și miR-223-3p;
2. creșteri semnificative ale expresiei miR-142-3p, miR-155-5p și miR-223-3p în placa aterosclerotică, care se corelează pozitiv cu nivelurile pri-miRNA asociate;
3. o scădere semnificativă a expresiei miR-92a în placă, în timp ce nivelul pri-miR-92a este crescut;
4. o asociere semnificativă între parametrii oxidativi și inflamatori, lipidele plasmatice și nivelul plasmatic al miARN ;
6. nivelul plasmatic al miR-142-3p s-a dovedit a fi un factor predictiv independent pentru evenimentele cardiovasculare la pacienții cu BAP.

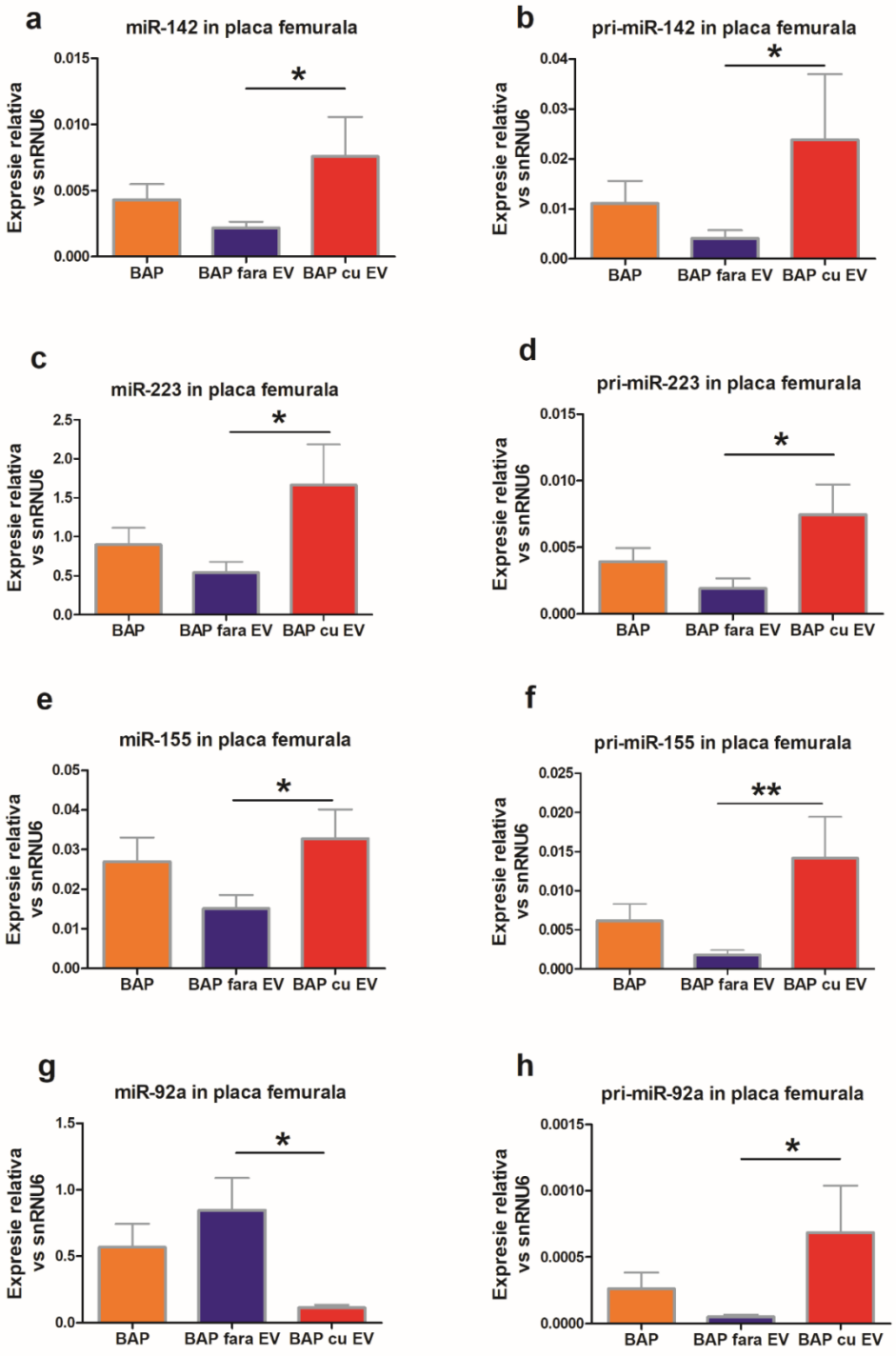


Figura 6. Nivelurile miARN și ale transcripților primari (pri-miARN) în plăcile aterosclerotice din arterele femurale de la pacienți cu boala arterelor periferice (BAP). Nivelurile miR-142 (**a**), miR-223 (**c**), miR-155 (**e**), miR-92a (**g**), pri-miR-142 (**b**), pri-miR-223 (**d**), pri-miR-155 (**f**), și pri-miR-92a (**h**) în plăci aterosclerotice femurale de la pacienți BAP cu evenimente cardiovasculare (BAP cu EV) post-operator comparativ cu cei fără EV (BAP fără EV). Datele sunt ilustrate ca histograme cu bară de eroare (SEM). Legenda: * valori $p < 0,05$, ** valori $p < 0,01$ comparativ cu BAP fără EV.

Din cunoștințele noastre, prezentul studiu este primul care abordează predicția evoluției bolii utilizând analiza comparativă a nivelului plasmatic și din placa de aterom a miARN la pacienții cu BAP. Am dovedit pentru prima dată legătura dintre nivelul miARN din placa aterosclerotică și expresia pri-miARN în placă.

Predicția precoce și rapidă a evoluției BAP poate optimiza decizia clinică pentru ajustarea intervențiilor individuale în cazul tratamentului acestor pacienți. Practicând o medicină personalizată, miR-142 poate contribui la stratificarea riscului pacienților cu BAP prezicând apariția evenimentelor cardiovasculare post-operator. Aceste noi date cresc posibilitatea utilizării terapiei având ca țintă miARN (inhibiția miR-142 in vivo) pentru a completa tratamentul cu statine în boala aterosclerotică, prin modularea mecanismului legat de miARN.

Cel mai important și nou rezultat al studiului este evidentierea potențialului miR-142 ca factor predictiv independent pentru apariția postoperator a evenimentelor cardiovasculare la pacienții cu BAP.

În concluzie, am demonstrat că miR-142-3p, miR-155-5p, miR-223-3p și miR-92a-3p sunt produși în placa aterosclerotică după cum se constată prin expresia specifică a pri-miARN și din corelațiile lor pozitive cu componentele cheie ale complexului de procesare miARN (enzimele Dicer și Drosha). De asemenea, am arătat că expresia miR-142-3p, miR-155-5p și miR-223-3p din placa aterosclerotică este asociată cu evenimentele cardiovasculare postoperatorii la pacienții cu BAP și corelate cu factorii de risc pro-aterogeni: metabolici, oxidativi și proinflamatorii. În final, bazat pe datele obținute din modelarea regresiei statistice, propunem miR-142-3p ca biomarker independent pentru prezicerea evenimentelor cardiovasculare la pacienții BAP.

Concluzii generale

1. Pacienții cu SAC prezintă alterarea parametrilor plasmatici asociați cu stresul oxidativ (scăderea PON1, creșterea MPO și CP) și inflamator (creșterea IL-1β și CRP) comparativ cu subiecții sănătoși.
2. Pacienții cu SAC având vârsta peste 65 de ani prezintă o creștere semnificativă a nivelurilor miR-223-3p atât în plasmă, cât și în placa de aterom carotidiană, comparativ cu pacienții cu SAC având vârsta sub 65 de ani.
3. Nivelul crescut de miR-223-3p în placa de aterom carotidiană la pacienții cu SAC cu vârsta peste 65 de ani este asociat cu o expresie crescută a pri-miR-223 din placa aterosclerotică.
4. Diabetul zaharat de tip II induce o alterare diferențiată a componentelor proteice ale subfractiilor HDL_2 și HDL_3 în plasma pacienților cu BAP, după cum urmează:

- HDL_2 prezintă o reducere atât a proteinei cât și a activității enzimatice a PON1, împreună cu scăderea apoAI și creșterea apoAII și apoCIII; nivelul proteinei MPO prezinta o creștere modestă.
- HDL_3 are o activitate enzimatica a PON1 redusă, în paralel cu nivelurile crescute de MPO și CP, asociate cu nivelurile crescute de MDA- și AGE-PON1, MDA- și AGE-CLU și AGE-apoAI.

5. Modificarea concentrațiilor plasmatice ale unor proteine alterate în HDL, precum CLU, PON1 și MPO, ar putea fi considerate indicatori ai severității bolii la pacienții cu BAP.
6. MiR-142 are potențialul de a fi considerat un factor predictiv independent pentru apariția postoperatorie a evenimentelor cardiovasculare la pacienții cu BAP.
7. Din punctul de vedere al chirurgului vascular, accesul la măsurarea nivelului miARN la pacienții cu SAC ar permite indicarea de măsuri timpurii de evaluarea a stării pacienților prin monitorizare ecografică la termen mai scurt pentru descoperirea restenozei la pacienții cu SAC operați și aplicarea tratamentului corespunzător.
8. Compoziția și funcția HDL sunt modificate la pacienții cu BAP și intr-un grad mai mare la pacienții BAP cu diabet zaharat de tip II. Nivelurile modificate ale CLU și ale activităților specifice ale PON1 și MPO sunt detectabile în plasma pacienților cu BAP. Întrucât izolarea și caracterizarea HDL este o procedură laborioasă, putem considera nivelurile plasmatice ale CLU, PON1 si MPO drept indicatori potențiali ai disfuncției HDL care pot fi utilizați pentru o mai bună stratificare a riscului la pacienții cu BAP.

Bibliografie

ABOU-ZAMZAM, A. M., JR., GOMEZ, N. R., MOLKARA, A., BANTA, J. E., TERUYA, T. H., KILLEEN, J. D. & BIANCHI, C. 2007. A prospective analysis of critical limb ischemia: factors leading to major primary amputation versus revascularization. *Ann Vasc Surg,* 21**,** 458-63.

ARORA, S., PATRA, S. K. & SAINI, R. 2016. HDL-A molecule with a multi-faceted role in coronary artery disease. *Clin Chim Acta,* 452**,** 66-81.

AUTHORS/TASK FORCE, M., GUIDELINES, E. S. C. C. F. P. & SOCIETIES, E. S. C. N. C. 2019. 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis,* 290**,** 140-205.

BORNFELDT, K. E., LINTON, M. F., FISHER, E. A. & GUYTON, J. R. 2021. JCL roundtable: Lipids and inflammation in atherosclerosis. *J Clin Lipidol,* 15**,** 3-17.

CAMONT, L., CHAPMAN, M. J. & KONTUSH, A. 2011. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med,* 17**,** 594-603.

CARNUTA, M. G., STANCU, C. S., TOMA, L., SANDA, G. M., NICULESCU, L. S., DELEANU, M., POPESCU, A. C., POPESCU, M. R., VLAD, A., DIMULESCU, D. R., SIMIONESCU, M. & SIMA, A. V. 2017. Dysfunctional high-density lipoproteins have distinct composition, diminished anti-inflammatory potential and discriminate acute coronary syndrome from stable coronary artery disease patients. *Sci Rep,* 7**,** 7295.

DAVIDSON, W. S., SILVA, R. A., CHANTEPIE, S., LAGOR, W. R., CHAPMAN, M. J. & KONTUSH, A. 2009. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 29**,** 870-6.

DEVAUX, Y., VAUSORT, M., GORETTI, E., NAZAROV, P. V., AZUAJE, F., GILSON, G., CORSTEN, M. F., SCHROEN, B., LAIR, M. L., HEYMANS, S. & WAGNER, D. R. 2012. Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clin Chem,* 58**,** 559-67.

EREN, E., YILMAZ, N. & AYDIN, O. 2012. High Density Lipoprotein and it's Dysfunction. *Open Biochem J,* 6**,** 78-93.

LARACH, D. B., DEGOMA, E. M. & RADER, D. J. 2012. Targeting high density lipoproteins in the prevention of cardiovascular disease? *Curr Cardiol Rep,* 14**,** 684-91.

LI, Z., YU, F., ZHOU, X., ZENG, S., ZHAN, Q., YUAN, M., YANG, Q., LIU, Y. & XIA, J. 2017. Promoter hypomethylation of microRNA223 gene is associated with atherosclerotic cerebral infarction. *Atherosclerosis,* 263**,** 237-243.

LUSCHER, T. F., LANDMESSER, U., VON ECKARDSTEIN, A. & FOGELMAN, A. M. 2014. High-density lipoprotein: vascular protective effects, dysfunction, and potential as therapeutic target. *Circ Res,* 114**,** 171-82.

MASKANAKIS, A., PATELIS, N., KARAOLANIS, G., DAVAKIS, S., SCHIZAS, D., PERREA, D., KLONARIS, C., GEORGOPOULOS, S., LIAKAKOS, T. & BAKOYIANNIS, C. 2018. Apolipoprotein J as a predictive biomarker for restenosis after carotid endarterectomy: a retrospective study. *Acta Pharmacol Sin,* 39**,** 1237-1242.

MUSUNURU, K. 2010. Atherogenic dyslipidemia: cardiovascular risk and dietary intervention. *Lipids,* 45**,** 907-14.

PARAHULEVA, M. S., LIPPS, C., PARVIZ, B., HOLSCHERMANN, H., SCHIEFFER, B., SCHULZ, R. & EULER, G. 2018. MicroRNA expression profile of human advanced coronary atherosclerotic plaques. *Sci Rep,* 8**,** 7823.

PARHOFER, K. G. 2015. Increasing HDL-cholesterol and prevention of atherosclerosis: A critical perspective. *Atheroscler Suppl,* 18**,** 109-11.

RODRIGUEZ-RIVERA, C., GARCIA, M. M., MOLINA-ALVAREZ, M., GONZALEZ-MARTIN, C. & GOICOECHEA, C. 2021. Clusterin: Always protecting. Synthesis, function and potential issues. *Biomed Pharmacother,* 134**,** 111174.

RUPAIMOOLE, R. & SLACK, F. J. 2017. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov,* 16**,** 203-222.

SHEN, Y., DING, F. H., SUN, J. T., PU, L. J., ZHANG, R. Y., ZHANG, Q., CHEN, Q. J., SHEN, W. F. & LU, L. 2015. Association of elevated apoA-I glycation and reduced HDL-associated paraoxonase1, 3 activity, and their interaction with angiographic severity of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol,* 14**,** 52.

TAN, Y., LIU, T. R., HU, S. W., TIAN, D., LI, C., ZHONG, J. K., SUN, H. G., LUO, T. T., LAI, W. Y. & GUO, Z.-G. 2014. Acute Coronary Syndrome Remodels the

Protein Cargo and Functions of High-Density Lipoprotein Subfractions. *PLOS ONE,* 9**,** e94264.

VARIJI, A., SHOKRI, Y., FALLAHPOUR, S., ZARGARI, M., BAGHERI, B., ABEDIANKENARI, S., ALIZADEH, A. & MAHROOZ, A. 2019. The combined utility of myeloperoxidase (MPO) and paraoxonase 1 (PON1) as two important HDL-associated enzymes in coronary artery disease: Which has a stronger predictive role? *Atherosclerosis,* 280**,** 7-13.

VOGIATZI, G., OIKONOMOU, E., DEFTEREOS, S., SIASOS, G. & TOUSOULIS, D. 2018. Peripheral artery disease: a micro-RNA-related condition? *Curr Opin Pharmacol,* 39**,** 105-112.

YAN, L., LIANG, M., HOU, X., ZHANG, Y., ZHANG, H., GUO, Z., JINYU, J., FENG, Z. & MEI, Z. 2019. The role of microRNA-16 in the pathogenesis of autoimmune diseases: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother,* 112**,** 108583.

LUCRĂRI PUBLICATE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL

Lucrări publicate în reviste indexate ISI – autor principal

Barbalata T, **Moraru OE**, Stancu CS, Devaux Y, Simionescu M, Sima AV, Niculescu LS. Increased miR-142 Levels in Plasma and Atherosclerotic Plaques from Peripheral Artery Disease Patients with Post-Surgery Cardiovascular Events. *Int J Mol Sci.* **2020** Dec 16;21(24):9600. doi: 10.3390/ijms21249600 (IF 5.923, Q1).

Lucrări publicate în reviste indexate ISI –co-autor

Barbalata T, **Moraru OE**, Stancu CS, Sima AV, Niculescu LS. MiR-223-3p levels in the plasma and atherosclerotic plaques are increased in aged patients with carotid artery stenosis; association with HDL-related proteins. *Mol Biol Rep.* **2021** (sub tipar). doi: 10.1007/s11033-021-06636-y (IF 2.316, Q3).

Sanda GM, Toma L, Barbalata T, **Moraru OE**, Niculescu LS, Sima AV, Stancu CS. Clusterin, paraoxonase 1, and myeloperoxidase alterations induce high-density lipoproteins dysfunction and contribute to peripheral artery disease; aggravation by type 2 diabetes mellitus. *Biofactors*. **2021** (sub tipar) doi: 10.1002/biof.1800 (IF 6.113, Q1).

Comunicări la manifestări ştiinţifice internaţionale – co-autor

Barbălată T, **Moraru OE**, Niculescu LS, Stancu CS, Simionescu M, Sima AV. A panel of circulating miRNAs could predict age-related post-endarterectomy cardiovascular events in carotid artery stenosis patients. The 4th MC and WG Meeting of COST Action CA17129 "*Catalysing transcriptomics research in cardiovascular disease*" (CardioRNA), Maastricht, The Netherlands, 12-14 February **2020**.

Barbalata T, **Moraru OE**, Niculescu LS, Stancu CS, Simionescu M, Sima AV. A panel of miRNAs and inflammatory markers are associated with hyperglycemia in peripheral artery diseases patients. CardioRNA Live! Meeting of CardioRNA COST Action CA17129 "*Catalysing transcriptomics research in cardiovascular disease*", 7-10 September **2020**.

Barbalata T, **Moraru OE**, Niculescu LS, Stancu CS, Simionescu M, Sima AV. A panel of miRNAs are associated with post-endarterectomy vascular events in carotid artery stenosis patients. *Science at a Glance Session* (SaaG) la *88th European Atherosclerosis Congress*, Online edition, 4-7 October 2020, *Atherosclerosis*, 315: e77, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.10.240, **2020**.

Sanda GM, Toma L, Barbălată T, **Moraru OE**, Niculescu LS, Sima AV, Stancu CS. Quantitative and qualitative alterations of plasma clusterin, paraoxonase 1, myeloperoxidase and HDL's apolipoproteins are aggravated by hyperglycemia in peripheral artery disease patients with diabetes. ePoster la *89th European Atherosclerosis Society* Congress Atherosclerosis, *Virtual congress*, 30 May – 2 June **2021**.

Şcoala de Studii Avansate a Academiei Române

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

cu titlul

Identificarea de noi biomarkeri epigenetici utilizabili pentru creşterea preciziei în predicţia evoluţiei bolii aterosclerotice

Conducator de doctorat
Acad. Maya Simionescu

Doctorand
Teodora Barbălată

2024

Cuprins

Cuvânt înainte....1

Listă abrevieri....3

Introducere şi obiectivele generale ale tezei....6

A. STADIUL ACTUAL AL CUNOAŞTERII....8

1. Sistemul cardiovascular în condiţii fiziologice şi patologice....8

Inima, artere coronare, artere periferice: structură şi funcţie....8

Structura peretelui arterial în condiţii fiziologice şi modificări în ateroscleroză....9

2. Metabolismul lipoproteinelor....16

Principalele clase de lipoproteine circulante şi proprietăţile lor....16

Lipoproteinele de înaltă densitate (HDL) – rol în condiţii fiziologice şi în ateroscleroză. 18

3. Epigenetica şi bolile cardiovasculare - moleculele de ARN necodant şi de ADN extracelular 24

Moleculele mici de ARN necodant – microARN....25

Moleculele mari de ARN necodant – long non-coding ARN....28

Moleculele de ADN circulante în plasmă – ADN extracelular (ADNcf) şi ADN mitocondrial (ADNmt) 31

4. Editarea genică prin tehnologia *CRISPR/dCas9* – o metodă de a corecta sinteza de HDL disfuncţional 33

Editarea genică – o nouă tehnologie de tratament a bolilor cardiovasculare....33

A. CONTRIBUŢII ORIGINALE....37

Studii preclinice *in vitro* şi *in vivo*....37

Obiectivul I. Hiperlipidemia: caracterizarea HDL disfuncţional şi distribuţia plasmatica a microARN; efectul unor tratamente hipolipemiante....37

Proiect I. 1. Hiperlipemia determină sinteza de HDL disfuncţional şi reducerea efluxului de colesterol la nivelul intestinului subţire la hamsterul hiperlipidemic; efectele benefice ale extractului de ghimbir în această patologie....37

Introducere şi obiective....37

Protocoale experimentale şi metode de analiză....39

Rezultate....45

Caracterizarea extractului de ghimbir....45

Extractul de ghimbir crește raportul HDL-C/colesterol total și diminuează stresul oxidativ în plasma hamsterilor hiperlipidemici....45

Extractul de ghimbir modulează expresia moleculelor componente ale HDL în intestinul subțire (apoA-I, PON1, MPO și ABCA1)....47

Extractul de ghimbir stimulează efluxul trans-intestinal de colesterol....49

Extractul de ghimbir restabilește expresia genică și proteică a factorilor de transcriere LXRα/β și PPARγ, precum și a modulatorilor acestora SIRT1 și TTC39B în intestinul subțire.....49

Extractul de ghimbir diminuează depozitele de lipide din valvele aortice.....51

Discuţii şi concluzii parţiale.....52

Proiect I. 2. Modularea microARN-urilor plasmatice în hamsterii hiperlipidemici prin administrarea probioticelor sau stoparea dietei grase.....56

Introducere şi obiective.....56

Protocoale experimentale şi metode de analiză.....57

Rezultate.....61

Nivelurile de lipide în serul și ficatul hamsterilor hiperlipidemici sunt reduse prin oprirea administrării dietei grase sau administrarea probioticelor simultan cu dieta grasă.....61

Nivelurile de microARN (miR-223-3p, miR-122-5p, miR-92a-3p și miR-486-5p) din serul și ficatul hamsterilor hiperlipidemici sunt scăzute atât de administrarea probioticelor simultan cu dieta grasă, cât și de oprirea administrării dietei grase.....63

Oprirea administrării dietei grase modulează expresia hepatică a unor gene implicate în reglarea metabolismului lipidic: HMGCS1, HMGCR, SR-BI și LDLR.....65

Discuţii şi concluzii parţiale.....67

Proiect I. 3. Reglarea nivelurilor microARN în hiperlipidemia indusă de dieta grasă la hamster 72

Introducere şi obiective.....72

Protocoale experimentale şi metode de analiză.....73

Rezultate.....76

Profilele de expresie ale miARN în plasma hamsterului hiperlipidemic.....76

Validarea miARN-urilor selectate în ficat și miocard prin qPCR.....78

Analiza funcțională – procesele biologice în care sunt implicate cele 3 miARN.....80

Discuţii şi concluzii parţiale.....82

Proiect I.4 Activarea transcripțională a apolipoproteinei A-I şi a paraoxonazei 1 din enterocite prin tehnologia CRISPR/dCas9; efectul benefic asupra celulelor endoteliale disfuncţionale86

Introducere şi obiective.....86

Protocoale experimentale şi metode de analiză.....88

Rezultate.....92

Activarea transcripțională a *ApoAI* endogenă prin tehnologia CRISPR/dCas9 în enterocite umane în cultură.....92

Activarea transcripțională a PON1 endogenă prin tehnologia CRISPR/dCas9 în enterocite umane în cultură.....93

Efectul supraexprimării *ApoA-I* și *PON1* endogene asupra expresiei proteice a receptorului SR-BI și a transportorilor ABCA1 și ABCG8 în enterocite umane în cultură.....94

Efectul supraexprimării *ApoA-I* și *PON1* endogene asupra expresiei proteice a factorilor de transcriere PPARγ, LXRs și SIRT1 implicați în reglarea metabolismului lipidic în enterocite umane în cultură.....95

Efectul mediului condiționat colectat de la enterocite Caco-2 care supraexprimă *ApoAI* și *PON1* endogene asupra celulelor endoteliale activate cu TNFα.....95

Discuţii şi concluzii parţiale.....97

Studii efectuate pe material uman obţinut de la pacienţi cu boli cardiovasculare.....103

Obiectivul II. Rolul clusterinei, al paraoxonazei 1 şi al mieloperoxodazei în disfuncţia HDL şi contribuţia la boala arterelor periferice; agravarea de către diabetul de tip 2.....103

Introducere şi obiective.....103

Protocoale experimentale şi metode de analiză.....104

Rezultate.....108

Caracteristicile clinice și parametrii biochimici ai pacienților PAD.....108

Parametri lipidici plasmatici.....109

Markeri ai stresului oxidativ în plasma pacienților PAD.....110

Corelații între nivelurile plasmatice de CLU, activitățile specifice ale PON1 și MPO, și hiperglicemie la pacienții PAD.....111

Caracterizarea fracțiilor HDL_2 și HDL_3 izolate de la pacienții PAD.....113

Potențialul anti-inflamator al subfracției HDL_3 la pacienții PAD-DM comparativ cu pacienții PAD 118

Discuţii şi concluzii parţiale.....120

Obiectivul III. Studii epigenetice (miR-142-3p, miR-223-3p; LIPCAR, MALAT1) la pacienţii cu boala arterelor periferice, stenoza arterelor carotide, infarct de miocard sau boala arterelor coronare 124

Proiect III. 1. Asocierea dintre nivelul crescut de miR-142 din plasma şi plăcile aterosclerotice ale pacienţilor cu boala arterelor periferice şi evoluţia post-operatorie a acestora.....124

Introducere şi obiective.....124

Protocoale experimentale şi metode de analiză.....126

Rezultate.....129

Principalii parametri plasmatici ai pacienților PAD.....129

Expresia miARN, pri-miARN și ARNm în plăcile de aterom colectate de la nivelul arterei femurale la pacienții PAD.....130

Nivelurile miARN în plasma pacienților PAD.....133

Asocierea între nivelurile plasmatice ale miARN și ECV post-operatorii ale pacienților PAD 136

Analiza funcțională – analiza Gene Ontology pentru identificarea proceselor biologice în care sunt implicate cele 4 miARN.....138

Discuţii şi concluzii parţiale.....141

Proiect III. 2. Determinarea nivelului miR-223-3p din plasma şi placa de aterom ale pacienţilor în vârstă cu stenoza arterelor carotide; asocierea cu proteine implicate în metabolismul HDL 145

Introducere şi obiective.....145

Protocoale experimentale şi metode de analiză.....146

Rezultate.....149

Principalii parametri plasmatici ai pacienților CAS.....149
Nivelurile pri-miR-223 în placi și nivelurile miR-223-3p în plăcile și plasma pacienților CAS 151
Expresia ARNm a moleculelor de interes în plăcile de aterom ale pacienților CAS....151
Corelațiile între parametri măsurați în plăcile de aterom și diverși parametri plasmatici ai pacienților CAS.....153
Asocierea nivelurilor plasmatice ale miR-223-3p cu vârsta pacienților CAS.....157
Discuţii şi concluzii parţiale.....158
Proiect III. 3. Evaluarea capacităţii ADN mitocondrial şi hsa-miR-142-3p de predicţie a evoluţiei pacienţilor după un infarct miocardic acut.....162
Introducere şi obiective.....162
Protocoale experimentale şi metode de analiză.....163
Rezultate.....167
Parametri plasmatici ai pacienților STEMI și variația lor la 6 luni post-infarct.....167
Nivelurile plasmatice ale ADNcf și ADNmt la pacienții STEMI și variația lor la 6 luni post-infarct 173
Corelații între nivelurile plasmatice ale miARN, ADNcf, ADNmt și principalii parametri plasmatici ai pacienților STEMI.....174
Asocierea parametrilor clinici cu MACE la 6 luni post-infarct.....175
Parametri plasmatici asociați cu MACE produse în timpul celor 6 luni de urmărire. .177
Asocierea nivelurilor ciculante ale microARN cu MACE produse în timpul celor 6 luni de monitorizare 180
Asocierea dintre nivelurile ADNcf și ADN mt și MACE produse în timpul celor 6 luni de monitorizare 181
Asocierile statistice între parametri plasmatici și cardiaci și ulterioarele MACE la pacienții STEMI 182
Nivelurile microARN selectate, ADNcf și ADNmt – ca predictori ai ulterioarelor MACE la pacienții STEMI.....186
Discuţii şi concluzii parţiale.....190
Proiect III.4. Analiza lncARN LIPCAR şi MALAT1 circulante şi corelarea cu evoluţia pacienţilor cu sindrom coronarian acut.....194
Introducere şi obiective.....194
Protocoale experimentale şi metode de analiză.....196
Rezultate.....199
Parametri biochimici ai pacienților SA, UA și STEMI.....199
Distribuția ARNnc în plasma pacienților SA, UA și STEMI.....201
Corelații între ARNlnc, miARN și principalii parametri biochimici în plasma pacienților BAC 203
Corelații între ARNlnc, miARN și principalii parametri în plasma pacienților STEMI. .205
ARNnc plasmatice ca predictori ai BAC vulnerabile: impactul hiperglicemiei.....206

Nivelurile plasmatice ale ARNlnc și miARN ca predictori ai MACE la pacienții STEMI 211
Discuţii şi concluzii parţiale....213
Concluzii generale....217
Bibliografie....222
EFICIENŢA ŞI DISEMINAREA CERCETĂRILOR....256
Lucrări publicate în reviste ISI – 6 autor principal....256
Lucrări publicate reviste ISI – 6 lucrări co-autor....257
Lucări publicate în reviste BDI....258
Rezumate publicate în reviste indexate ISI – 4 (2 autor principal)....258
Comunicări orale susţinute la manifestări ştiinţifice internaţionale: 5 comunicări....259
Postere prezentate la manifestări ştiinţifice internaţionale: 6 postere....260
Specializări şi cursuri realizate pe perioada programului doctoral....261
Brevete înregistrate....261
Premii câştigate....261
FINANŢAREA CERCETĂRILOR ŞI COLABORĂRI ÎN PROIECTE DE CERCETARE262

REZUMAT

Cuvinte cheie: Ateroscleroză; Biomarkeri; Epigenetică; HDL; miARN; Statistică.

Număr total pagini – 261

Număr de figuri în partea I – 17

Număr de tabele în partea I – 1

Număr de figure în partea a II-a – 63

Număr de tabele în partea a II-a – 35

Indicaţii bibliografice – 326

Lucrări publicate în reviste internaţionale indexate ISI – 12 (6 autor principal)

Rezumate publicate în reviste indexate ISI – 4 (2 autor principal)

Comunicări orale prezentate la manifestări ştiinţifice internaţionale – 5 comunicări

Postere prezentate la manifestări ştiinţifice internaţionale – 6

Specializări şi cursuri efectuate – 4

Premii – 2

Participarea în proiecte de cercetare – 7

În **prima parte** a lucrării de doctorat am descris pe scurt aspecte teoretice legate de sistemul cardiovascular atât în condiţii fiziologice, cât şi patologice, în special legate de iniţierea formării şi progresia plăcii aterosclerotice. De asemenea, sunt menţionate aspecte cu privire la metabolismul lipoproteinelor circulante, cu precădere particulele de HDL, precum şi aspecte despre biologia moleculelor de ARN necodante. Bolile cardiovasculare (BCV) rămân principala cauză de morbiditate şi mortalitate la nivel mondial, în ciuda progresului tehnologic şi medical. La baza acestor boli stă ateroscleroza, o patologie multifactorială inflamatorie cronică care afectează arterele medii şi mari din diverse paturi vasculare (Schaftenaar et al. 2016). Ateroscleroza presupune proliferarea matricei extracelulare a celulelor rezidente din peretele arterial, acumularea de lipide şi calciu la acest nivel, adeziunea monocitelor şi plachetelor circulante la nivelul endoteliului, un proces care declanşează o cascadă de modificări moleculare şi structurale care, în cele din urmă, conduc la obstrucţia circulaţiei sangvine la nivelul vasului afectat (Libby et al. 2011).

În prezent, există o serie de parametri utilizaţi în practica medicală care furnizează informaţii cu privire la riscul pe care pacienţii îl prezintă în ceea ce priveşte dezvoltarea de boli cardiovasculare. Printre aceşti parametri se numără nivelurile crescute de colesterol total, de colesterol de la nivelul lipoproteinelor de joasă densitate (LDL-C) sau nivelurile scăzute de colesterol din lipoproteinele de înaltă densitate (HDL-C), însă acestea nu sunt în totalitate suficiente pentru a indica pacienţii aflaţi la risc. Din acest motiv există încă o nevoie urgentă de a identifica noi parametri sensibili, specifici şi precişi care să vină în completarea celor enumeraţi mai sus. În acest context, se face remarcată o serie de molecule de natură epigenetică, de tipul microARN-urilor (Vogiatzi et al. 2018) sau al ARN-urilor necodante lungi (Holdt et al. 2010), care sunt promiţătoare în ceea ce priveşte atât diagnosticul, cât şi prognosticul timpuriu al evoluţiei bolii la pacienţii cardiovasculari.

Epigenetica studiază totalitatea modificărilor care apar la nivelul materialului genetic, modificări care nu sunt moştenite, ci dobândite ca urmare a impactului pe care îl au factorii externi asupra materialului genetic. O direcţie de cercetare a epigeneticii vizează moleculele de ARN necodante (ARNnc), care, prin funcţiile pe care le îndeplinesc în celulă, au indirect efect asupra expresiei genice şi, deci asupra ADN.

Este cunoscut faptul că doar 2% din genomul uman codifică proteine, în timp ce restul a fost, până recent, considerat material genetic redundant, fără importanţă biologică, aşa numitul „*junk DNA*”. Ultimele două decenii de cercetări în domeniul genomicii şi transcriptomicii au contrazis această idee şi

au demonstrat faptul că regiunile ADN care nu codifică proteine, transcrise în transcripţi de ARN necodant, au un rol crucial în menţinerea homeostaziei celulare.

Prin termenul „ARN necodant" (ARNnc) înţelegem totalitatea tipurilor de molecule de ARN diferite de ARN codant, şi anume ARN mesager (ARNm).

ARNnc se împart, în funcţie de mărime, în două categorii principale:

- ARN necodante de dimensiune mică (<200 nucleotide) –microARN (miARN), ARN mic de interferenţă (ARNsi) sau ARN de interferenţă piwi (ARNpi);
- ARN necodante de dimensiune mare (>200 nucleotide) –ARN necodante lungi (ARNlnc), ARN circulare (ARNcirc) sau ARN de tip *enhancer* (ARNe) (Zhang et al. 2019).

Moleculele de **miARN** sunt molecule de ARN necodant înalt conservate, cu o dimensiune de aproximativ 20 de nucleotide, înscriindu-se astfel în categoria ARN necodante reglatoare de dimensiuni mici. Acestea sunt implicate în reglajul expresiei genice, prin faptul că se leagă şi blochează moleculele de ARNm.

Cu toate că această categorie de molecule a fost observată iniţial în studiul cancerului, ulterior a fost demonstrată implicarea lor şi în numeroase alte patologii, cum ar fi diabetul, bolile auto-imune sau afecţiunile cardiovasculare. Datorită posibilităţii de a fi măsurate cu uşurinţă în circulaţie sau in probe de ţesut, precum şi datorită stabilităţii lor ridicate, miARN au devenit rapid candidaţi pentru a servi drept biomarkeri pentru diversele patologii. În ceea ce priveşte BCV, există diverse miARN care au fost propuse ca markeri, cum ar fi miR-133 pentru insuficienţa cardiacă sau miR-21 pentru fibroza cardiacă şi ateroscleroză (Barwari et al. 2016). De asemenea, într-un studiu desfăşurat în laboratorul nostru, colegii au demonstrat că miR-486 şi miR-92a au potenţialul de a discrimina între pacienţii cu boala arterelor coronare (BAC) vulnerabilă faţă de cei stabili (Niculescu et al. 2015).

O a doua categorie de ARN necodant care pare să prezinte potenţial prognostic sau diagnostic pentru diverse patolgii, şi care în ultimii ani a primit o atenţie deosebită sunt ARN-urile necodante lungi (**lncARN**). Acestea au o lungime de peste 200 de nucleotide şi sunt implicate într-o multitudine de procese biologice, cum sunt ciclul celular, diferenţierea celulară, precum şi în diverse patologii (Bridges et al. 2021). Studiile arată că lncARN prezintă niveluri de expresie mai scăzute decât ARNm sau miARN, dar prezintă şi specificitate tisulară mai crescută, ceea ce le recomandă ca markeri ai diverselor patologii. O altă deosebire constă în gradul scăzut de conservare al lncARN între specii, deşi aceasta nu e o regulă generală (Johnsson et al. 2014).

Pentru a îndeplini obiectivele propuse în prezenta teză de doctorat am utilizat tehnici de biologie moleculară, biochimie şi culturi celulare, care au fost descrise în secţiunile „Protocoale experimentale şi metode de analiză" ale fiecărui studiu. În experimentele desfăşurate pe perioada programului doctoral, am pus la punct metodele de cuantificare a long non-coding ARN, precum şi a ADN circulant extracelular (ADNcf) din plasma pacienţilor prin Real-Time PCR.

Cea de-**a doua parte** a tezei de doctorat cuprinde contribuţiile originale aduse în domeniul de cercetare şi este structurată în două capitole principale, care cuprind în total 9 studii (vezi Cuprinsul).

Principalele rezultate ale primelor 4 **studii preclinice *in vitro* şi *in vivo*** (primul capitol) sunt următoarele:

(i) Hiperlipidemia determină producţia de HDL disfuncţional şi diminuează astfel efluxul de colesterol la nivelul intestinului subţire în hamsterul hiperlipidemic. Extractul de ghimbir are capacitatea de a reversa şi îmbunătăţi aceste procese, contribuind la homeostazia metabolismului lipidic. Rezultatele prezentate în acest studiu au fost publicate în articolul cu titlul: **Hyperlipidemia Determines Dysfunctional HDL Production and Impedes Cholesterol Efflux in the Small Intestine: Alleviation by Ginger Extract**, autori: **Teodora Barbălată**, Mariana Deleanu, Mihaela Georgiana Cărnuţă, Loredan Ştefan Niculescu, Mina Răileanu, Anca Volumnia Sima, Camelia Sorina Stancu. publicat în revista *Molecular Nutrition and Food Research* **2019**, 63(19) :e1900029. DOI: 10.1002/mnfr.201900029. **Factor de impact la momentul publicării (2019): 5,309 (Q1)**; factor de impact în 2022: 5,2 (Q1).

(ii) Administrarea probioticelor sau oprirea dietei grase la hamsterii hiperlipidemici au ca efect scăderea nivelurilor serice şi hepatice ale miR-223-3p, miR-122a-5p, miR-92a-3p şi miR-486-5p. Rezultatele obţinute în cadrul acestui studiu au fost publicate în articolul cu titlul: **Probiotics administration or the high-fat diet arrest modulates microRNAs levels in hyperlipidemic hamsters,** autori: Loredan S. Niculescu, Mădălina D. Dulceanu, Camelia S. Stancu, Mihaela G. Cărnuţă, **Teodora Barbălată**, Anca V. Sima, în revista *Journal of Functional Foods* **2019**, 56, 295-302, DOI 10.1016/j.jff.2019.03.036. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2019): 3,701 (Q1)**, iar în 2022: 5,6 (Q1).

(iii) Hiperlipidemia indusă prin administrarea unei diete grase are ca efect creşterea nivelurilor miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-223-3p în miocardul, ficatul, şi intestinul subţire ale hamsterilor hiperlipidemici. Rezultatele obţinute în cadrul acestui studiu au fost publicate în

articolul cu titlul **Regulation of microRNAs in high-fat diet induced hyperlipidemic hamsters,** autori **Teodora Barbălată**, Lu Zhang, Mădălina D. Dulceanu, Camelia S. Stancu, Yvan Devaux, Anca V. Sima, Loredan S. Niculescu, în revista *Scientific Reports* **2020**, 10: 20549, DOI 10.1038/s41598-020-77539-4. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2020): 4,38 (Q1),** iar în anul 2022: 4,6 (Q2).

(iv) Activarea transcripţională a apolipoproteinei A-I şi a paraoxonazei 1 utilizand editarea genică prin tehnologia CRISPR/dCas9 în enterocite umane în cultură îmbunătăţeşte calitatea HDL disfuncţional. De asemenea, mediul condiţionat colectat de la enterocitele transfectate are un efectul benefic asupra celulelor endoteliale disfuncţionale. Rezultatele prezentate în acest studiu au fost publicate în articolul cu titlul **CRISPR/dCas9 Transcriptional Activation of Endogenous Apolipoprotein AI and Paraoxonase 1 in Enterocytes Alleviates Endothelial Cell Dysfunction**, autori: Laura Toma, Teodora Barbălată, Gabriela M. Sanda, Loredan S. Niculescu, Anca V. Sima, Camelia S. Stancu, publicat în revista *Biomolecules* **2021**, 11, 1769. DOI: 10.3390/biom11121769. **Factor de impact la momentul publicării (2021): 6,064 (Q2)**; factor de impact în 2022: 5,5 (Q1).

Principalele rezultate ale celor 5 studii cuprinse în cel de-al doilea capitol cuprinde **studii efectuate pe material uman obţinut de la pacienţi cu boli cardiovasculare**:

(i) Disfuncţia HDL este caracterizată de nivelurile crescute ale clusterinei şi ale mieloperoxidazei, precum şi de nivelurile scăzute ale paraoxonazei 1 la pacienţii cu boala arterelor periferice (PAD – peripheral artery disease), iar aceste modificări sunt agravate de prezenţa diabetului de tip 2. Datele obţinute în cadrul acestui studiu au fost publicate în articolul cu titlul **Clusterin, paraoxonase 1, and myeloperoxidase alterations induce high-density lipoproteins dysfunction and contribute to peripheral artery disease; aggravation by type 2 diabetes mellitus**, autori: Gabriela M. Sanda, Laura Toma, **Teodora Barbălată**, Oriana E. Moraru, Loredan S. Niculescu, Anca V. Sima, Camelia S. Stancu în revista *BioFactors* **2021**: 1-15, DOI 10.1002/biof.1800. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2021): 6,438 (Q1)**, iar în anul 2022: 6,0 (Q1).

(ii) Nivelurile plasmatice ale miR-142-3p sunt crescute la pacienţii PAD, precum şi în plăcile de aterom izolate de la aceştia, ceea ce recomandă acet miARN ca posibil biomarker pentru evoluţia post-operatorie nefavorabilă a pacienţilor. Rezultatele obţinute în acest capitol au fost publicate în articolul cu titlul **Increased miR-142 Levels in Plasma and**

Atherosclerotic Plaques from Peripheral Artery Disease Patients with Post-Surgery Cardiovascular Events, autori: **Teodora Barbălată,** Oriana E. Moraru, Camelia S. Stancu, Yvan Devaux, Maya Simionescu, Anca V. Sima, Loredan S. Niculescu, în revista *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, 21: 9600, DOI: 10.3390/ijms21249600. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2020): 5,92 (Q1),**.

(iii) Nivelurile crescute ale miR-223-3p din plasmă şi plăcile de aterom de la pacienţii cu stenoza arterelor carotide (CAS) sunt corelate cu vârtsa înaintată a pacienţilor şi cu proteine implicate în metabolismul HDL. Rezultatele obţinute în acest capitol au fost publicate în articolul cu titlul **MiR-223-3p levels in the plasma and atherosclerotic plaques are increased in aged patients with carotid artery stenosis; association with HDL-related proteins,** autori: **Teodora Barbălată**, Oriana E. Moraru, Camelia S. Stancu, Anca V. Sima, Loredan S. Niculescu, în revista *Molecular Biology Reports* **2021**, DOI: 10.1007/s11033-021-06636-y. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2021): 2,742 (Q4)**

(iv) Nivelurile plasmatice crescute ale ADN mitocondrial şi miR-142-3p sunt un indicator al evoluţiei nefavoraile a pacienţilor după un infarct miocardic cu supradenivelare de segment ST (STEMI). Rezultatele obţinute în acest capitol au fost publicate în 2 articole: primul articol are titlul **Mitochondrial DNA Together with miR-142-3p in Plasma Can Predict Unfavorable Outcomes in Patients after Acute Myocardial Infarction,** autori: **Teodora Barbălată**, Alina I. Scărlătescu, Gabriela M. Sanda, Laura Toma, Camelia S. Stancu, Maria Dorobanţu, Miruna M. Micheu, Anca V. Sima, Loredan S. Niculescu, în revista *International Journal of Molecular Sciences* **2022***, 23: 9947*, DOI: 10.3390/ijms23179947. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2022): 5,6 (Q1)**; cel de-al doilea articol cuprinde parţial rezultate din acest capitol al tezei şi are titlul **miR-146a-5p, miR-223-3p and miR-142-3p as Potential Predictors of Major Adverse Cardiac Events in Young Patients with Acute ST Elevation Myocardial Infarction—Added Value over Left Ventricular Myocardial Work Indices**, autori: Alina Ioana Scărlătescu, **Teodora Barbălată**, Anca Volumnia Sima, Camelia Stancu, Loredan Ştefan Niculescu, Miruna Mihaela Micheu, în revista *Diagnostics (Basel)*, **2022** 12(8):1946, DOI: 10.3390/diagnostics12081946. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2022): 3,6 (Q2).**

(v) Evoluția nefavorabilă a pacienților cu sindrom coronarian acut se corelează cu nivelurile circulante crescute ale ARNlnc LIPCAR şi MALAT1, ceea ce recomandă aceste două ARNlnc ca posibili biomarkeri pentru evoluția pacienților. Rezultatele obținute în acest capitol au fost publicate într-un articol cu titlul **Elevated Levels of Circulating lncRNAs LIPCAR and MALAT1 Predict an Unfavorable Outcome in Acute Coronary Syndrome Patients**, autori: **Teodora Barbălată**, Loredan S. Niculescu, Camelia S. Stancu, Florence Pinet, Anca V. Sima, în revista *International Journal of Molecular Sciences* 2023, 24(15):12076, DOI: 10.3390/ijms241512076. **Factorul de impact al revistei în 2022: 5,6 (Q1).**

Printre cele mai relevante rezultate obținute în urma studiilor realizate pentru prezenta teză se numără următoarele:

Studiul care a analizat asocierea dintre nivelul crescut de miR-142 din plasma şi plăcile aterosclerotice ale pacienților cu boala arterelor periferice (PAD) şi evoluția post-operatorie a acestora a relevat că în comparație cu pacienții PAD fără eventimente cardiovasculare ulterioare (fără ECV), pacienții PAD cu ECV au prezentat niveluri crescute ale miR-142-3p, miR-223-3p şi miR-155-5p în plăcile aterosclerotice, rezultate care s-au corelat pozitiv cu nivelurile transcripților primari ai miARN (pri-miARN) (Figura 1). De asemenea, prezența pri-miARN la nivelul plăcilor de aterom PAD, corelată cu prezența ARNm pentru Drosha şi Dicer la acest nivel, indică posibila sinteză locală a miARN de interes în plăci. Analiza statistică (Tabelul 1) a rezulatelor obținute în acest studiu, sugerează că miR-142-3p circulant prezintă potențialul de a fi predictor independent pentru producerea de ECV post-operatorii la pacienții PAD.

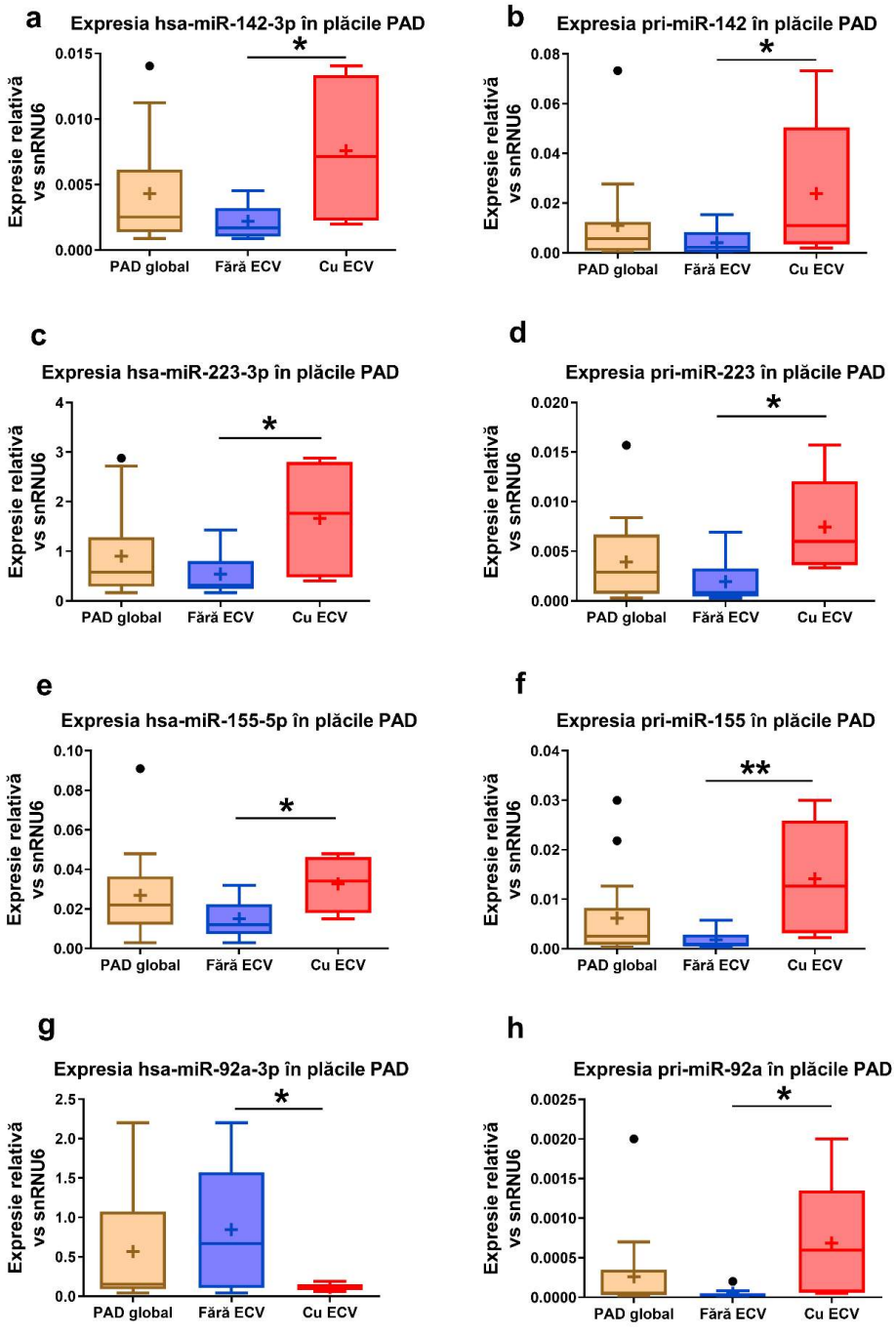


Figura 1. Nivelurile miARN şi ale transcripţilor lor primari (pri-miARN) în plăcile aterosclerotice recoltate de la pacienţii PAD. Nivelurile miR-142 (a), miR-223 (c), miR-155 (e), miR-92a (g), pri-miR-142 (b), pri-miR-223 (d), pri-miR-155 (f) şi pri-miR-92a (h) în plăcile aterosclerotice ale pacienţilor PAD cu ECV comparativ cu cei fără ECV. Datele sunt ilustrate ca boxplot-uri cu Tukey whiskers, linia reprezintă mediana, iar semnul plus (+) reprezintă media. *p<0,05, **p<0,01 vs ”fără ECV”

Tabelul 1. Analiza ROC pentru determinarea potenţialului predictiv al fiecărui miARN circulant, precum şi a combinaţiei celor 4 miARN pentru ECV post-operatorii la pacienţii PAD. SE, eroare standard

Area Under the Curve					
Variabile*	**Arie**	**Eroare standard [a]**	**Sig. asimptotic[b]**	**Intervalul de confidenţă 95% asimptotic**	
				Limită inferioară	**Limită superioară**
Plasma miR-142-3p	0.861	0.068	0.007	0.727	0.995
Plasma miR-223-3p	0.451	0.124	0.717	0.207	0.695
Plasma miR-155-5p	0.632	0.152	0.325	0.335	0.929
Plasma miR-92a-3p	0.396	0.099	0.437	0.202	0.589
All plasma miRNAs	0.924	0.050	0.002	0.825	1.000

* Adjusted for age and gender. a. Under the nonparametric assumption. b. Null hypothesis: true area = 0.5

Principalele rezultate ale studiul în care am analizat potenţialul de predicţie al evenimentelor cardiovasculare majore (MACE) la pacienţii STEMI al unor noi markeri, cum sunt ARNnc extracelulare (miARN) sau ADN extracelular (ADNcf) şi ADN mitocondrial (ADNmt) circulante sunt: pacienţii STEMI prezintă următoarele modificări în momentul externării din spital (T_1) comparativ cu momentul internării (T_0): (i) niveluri crescute ale tuturor celor 6 miARN analizate (hsa-miR-223-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-125a-5p şi hsa-miR-146a-5p); (ii) niveluri plasmatice crescute ale ADNcf şi ADNmt. Totodată, comparativ cu pacienţii STEMI fără MACE, cei cu MACE au prezentat: (i) niveluri crescute ale tuturor celor 6 miARN analizate (hsa-miR-223-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-125a-5p şi hsa-miR-146a-5p) (Figura 2); (ii) niveluri crescute ale ADNcf şi ADNmt (Figura 3). În urma analizei statistice BLR şi ROC, am raportat pentru prima dată că nivelurile plasmatice ale ADNmt împreună cu cele ale miR-142-3p pot prezice cu acurateţe evoluţia nefavorabilă a pacienţilor STEMI (Tabel 2).

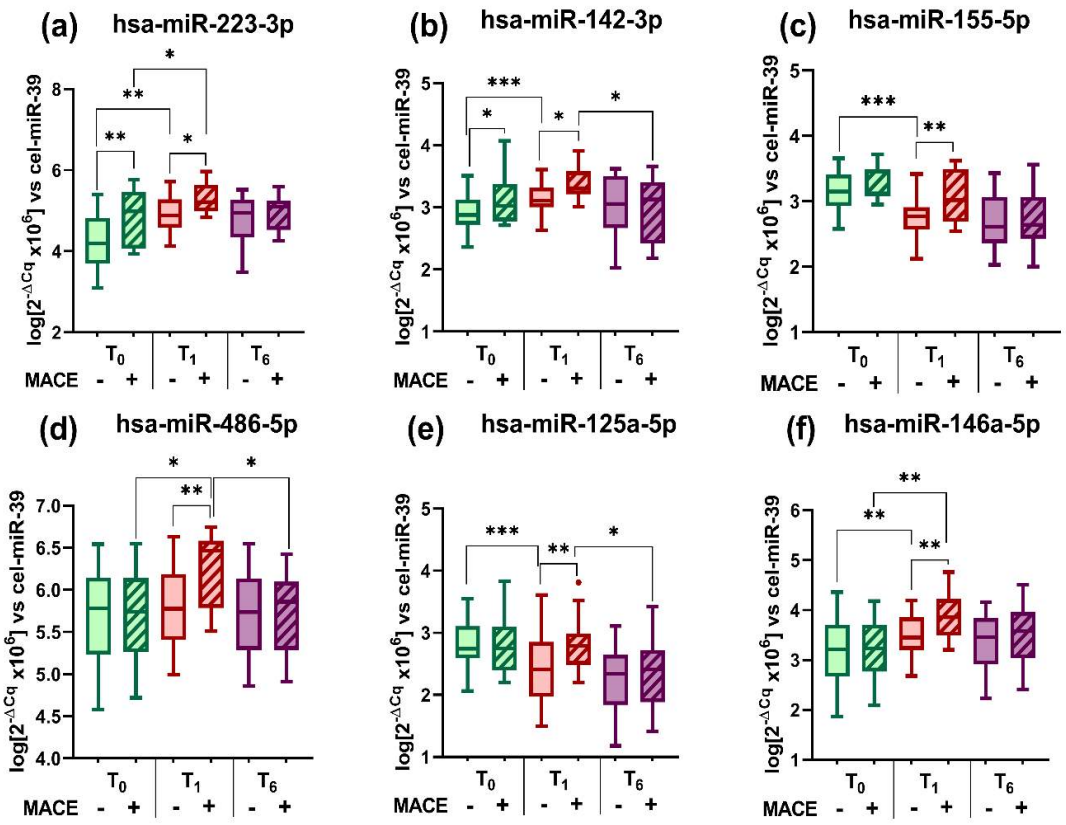


Figura 2. Variaţia miARN (a-f) în plasma pacienţilor STEMI la momentele T_0, T_1 şi T_6 grupaţi în funcţie de incidenţa MACE în timpul celor 6 luni de monitorizare. Datele sunt ilustrate ca boxplot-uri cu Tukey whiskers, linia orizontală reprezintă mediana. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

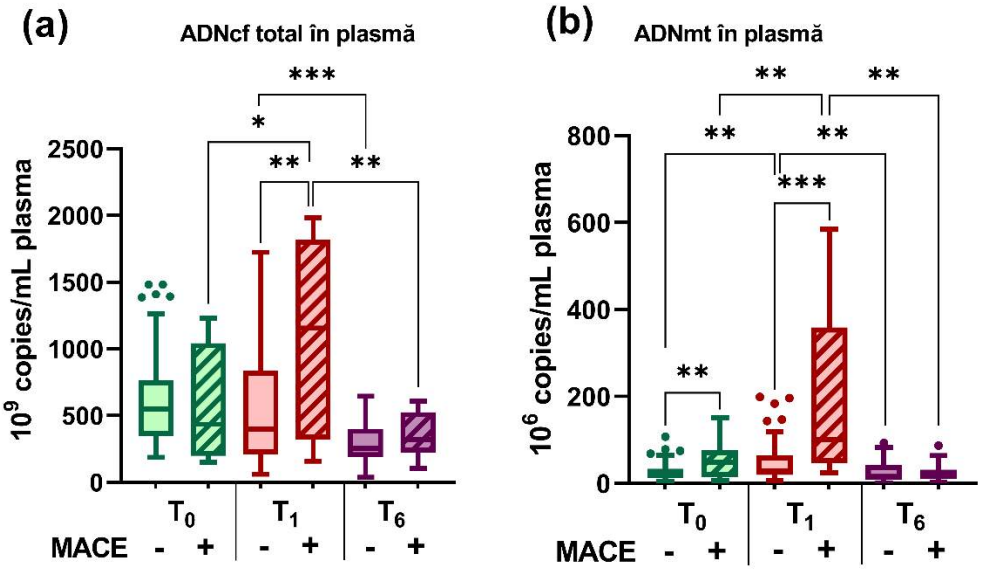


Figura 3. Variaţia ADNcf total (a) şi a ADNmt (b) în plasma pacienţilor STEMI la momentele T_0, T_1 şi T_6 grupaţi în funcţie de incidenţa MACE în timpul celor 6 luni de monitorizare. Datele sunt ilustrate ca boxplot-uri cu Tukey whiskers, linia orizontală reprezintă mediana. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Tabelul 3. Analiza ROC pentru determinarea potenţialului predictiv al modelelor uni sau multivariate pentru MACE la pacienţii STEMI, utilizând valorile plasmatice ale miARN, ale ADNcf şi ale ADNmt determinate în momentul externării din spital (T_1).

Area Under the Curve					
Variabile*	**Arie**	**Eroare standard** [a]	**Valoare *p*** [b]	**Interval de confidenţă asimptotic 95%**	
				Limită inferioară	**Limită superioară**
Modele univariate					
hsa-miR-223-3p	0.788	0.071	5.18×10^{-3}	0.648	0.927
hsa-miR-142-3p	0.832	0.069	1.27×10^{-3}	0.696	0.968
hsa-miR-155-5p	0.742	0.094	0.019	0.558	0.927
hsa-miR-486-5p	0.718	0.096	0.034	0.530	0.906
hsa-miR-125a-5p	0.782	0.074	6.21×10^{-3}	0.636	0.928
hsa-miR-146a-5p	0.785	0.083	5.67×10^{-3}	0.622	0.948
cfDNA	0.722	0.102	0.029	0.523	0.921
mtDNA	0.832	0.069	1.09×10^{-3}	0.698	0.966
Model multivariat 1 (toate cele 6 miARN)	0.796	0.081	4.20×10^{-3}	0.638	0.954
Model multivariat 2 (toate cele 6 miARN, ADNcf şi ADNmt)	0.975	0.021	4.45×10^{-6}	0.934	1.000

Model multivariat 3 (ADNmt şi hsa-miR-142-3p)	0.833	0.069	1.17 x10^{-3}	0.697	0.968
Model multivariat 4 (ADNmt, hsa-miR-142-3p şi hsa-miR-223-3p)	0.833	0.070	1.17 x10^{-3}	0.696	0.970
Model multivariat 5 (ADNmt, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-223-3p şi hsa-miR-146a-5p)	0.903	0.046	8.37 x10^{-5}	0.813	0.993
* Ajustate pentru vârstă şi sex (masculin). a. În condiţii non-parametrice. b. Ipoteza de nul: true area = 0.5					

În urma studiului care a vizat investigarea potenţialului de discriminare al pacienţilor cu sindrom coronarian acut (ACS) la risc pentru ARNlnc LIPCAR şi MALAT1, precum şi a două miARN relevante, am concluzionat următoarele că la pacienţii cu angină stabilă (SA) şi angină instabilă (UA): (i) nivelurile LIPCAR, MALAT1, hsa-miR-155-5p şi hsa-miR-142-3p sunt semnificativ crescute în plasma pacienţilor cu BAC vulnerabili (UA) comparativ cu cei stabili (SA); (ii) nivelurile LIPCAR, MALAT1 şi miR-142-3p sunt semnificativ crescute la pacienţii UA hiperglicemici (UA-HG) comparativ cu cei normoglicemic (NG), în timp ce miR-142-3p a prezentat valori crescute şi la pacienţii SA-HG vs SA-NG (Figura 4); (iii) modelul minimal ROC multivariat care poate discrimina pacienţii cu boala arterelor coronare vulnerabili este alcătuit din LIPCAR şi MALAT, cu o uşoară îmbunătăţire în urma adăugării miR-155-5p (Tabelul 3).

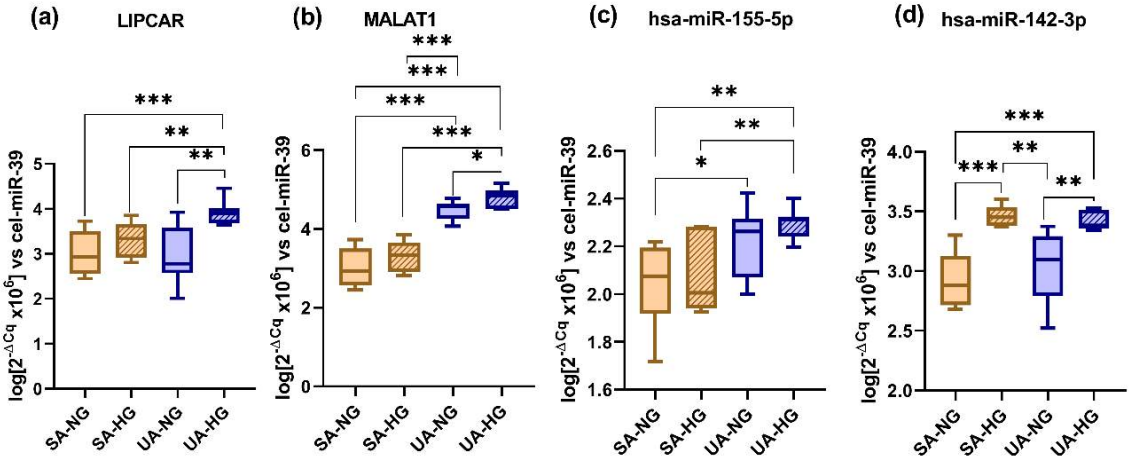


Figura 4. Nivelurile ARNnc în plasma pacienţilor SA şi UA hiperglicemici (HG) comparativ cu cei normoglicemici (NG): LIPCAR (a), MALAT1 (b), miR-155-5p (c) şi miR-142-3p (d). Datele sunt ilustrate ca boxplot-uri cu Tukey whiskers, linia orizontală reprezintă mediana. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Tabelul 3. Analiza ROC pentru determinarea potenţialului de discriminare al modelelor uni- şi multivariate pentru diagnosticul ACS – UA versus SA, utilizând ARNlnc LIPCAR şi MALAT1 şi miARN hsa-miR-155-5p şi hsa-miR-142-3p

Area Under the Curve					
Variabile*	**Arie**	**Deviaţie standard [a]**	**Valoare p [b]**	**Intevalul de confidenţă 95% asimptotic**	
				Limită inferioară	**Limită superioară**
Modele univariate					
LIPCAR	0.737	0.094	0.022	0.554	0.921
MALAT1	0.773	0.080	6.27×10^{-3}	0.617	0.930
miR-155-5p	0.812	0.087	3.55×10^{-3}	0.643	0.944
miR-142-3p	0.596	0.104	0.355	0.393	0.799
Modele multivariate					
Modelul multivariat 1 (LIPCAR şi MALAT1)	0.870	0.065	7.34×10^{-4}	0.742	0.999
Modelul multivariat 2 (LIPCAR, MALAT1 şi miR-155-5p)	0.938	0.047	4.08×10^{-4}	0.846	1.000
Modelul multivariat 3 (LIPCAR, MALAT1 şi miR-142-3p)	0.836	0.081	5.92×10^{-3}	0.677	0.994
* Ajustate pentru vârstă şi sex (masculin ca risc). A. În condiţii nonparametrice. B. Ipoteza de nul: true area = 0.5.					

În concluzie, studiile pe care le-am desfăşurat pe perioada programului doctoral şi care au avut ca scop comun identificarea de noi biomarkeri epigenetici care să contribuie la creşterea acurateţei prognosticului bolii cardiovasculare au condus la identificarea unor molecule de tipul microARN şi lncARN care sunt utile în acest sens. Astfel, s-au remarcat miR-142-3p, LIPCAR şi MALAT1.

Rezultatatele obţinute în aceste studii încurajează investigarea mecanismelor moleculare în care sunt implicate şi pe care le modulează aceste molecule de ARN necodante, precum şi validarea lor ca biomarkeri ai diverselor boli cardiovasculare pe cohorte mai mari de pacienţii. Aceste perspective deschise de rezulatele cercetării pot veni în sprijinul introducerii lor în practica medicală curentă şi a atingerii principalului scop al medicinii moderne, şi anume medicina personalizată.

BIBLIOGRAFIE

1. Barwari, T., Joshi, A. and Mayr, M., 2016. *MicroRNAs in Cardiovascular Disease*, J Am Coll Cardiol, 68(23), pp. 2577-2584.
2. Bhat, S. A., Ahmad, S. M., Mumtaz, P. T., Malik, A. A., Dar, M. A., Urwat, U., Shah, R. A. and Ganai, N. A., 2016. *Long non-coding RNAs: Mechanism of action and functional utility*, Noncoding RNA Res, 1(1), pp. 43-50.
3. Blank-Giwojna, A., Postepska-Igielska, A. and Grummt, I., 2019. *lncRNA KHPS1 Activates a Poised Enhancer by Triplex-Dependent Recruitment of Epigenomic Regulators*, Cell Rep, 26(11), pp. 2904-2915 e4.
4. Bridges, M. C., Daulagala, A. C. and Kourtidis, A., 2021. *LNCcation: lncRNA localization and function*, J Cell Biol, 220(2).
5. Dueva, R., Akopyan, K., Pederiva, C., Trevisan, D., Dhanjal, S., Lindqvist, A. and Farnebo, M., 2019. *Neutralization of the Positive Charges on Histone Tails by RNA Promotes an Open Chromatin Structure*, Cell Chem Biol, 26(10), pp. 1436-1449 e5.
6. Holdt, L. M., Beutner, F., Scholz, M., Gielen, S., Gabel, G., Bergert, H., Schuler, G., Thiery, J. and Teupser, D., 2010. *ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 30(3), pp. 620-7.
7. Johnsson, P., Lipovich, L., Grander, D. and Morris, K. V., 2014. *Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function*, Biochim Biophys Acta, 1840(3), pp. 1063-71.
8. Libby, P., Ridker, P. M. and Hansson, G. K., 2011. *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*, Nature, 473(7347), pp. 317-25.
9. Niculescu, L. S., Simionescu, N., Sanda, G. M., Carnuta, M. G., Stancu, C. S., Popescu, A. C., Popescu, M. R., Vlad, A., Dimulescu, D. R., Simionescu, M. and Sima, A. V., 2015. *MiR-486 and miR-92a Identified in Circulating HDL Discriminate between Stable and Vulnerable Coronary Artery Disease Patients*, PLoS One, 10(10), pp. e0140958.
10. Noh, J. H., Kim, K. M., McClusky, W. G., Abdelmohsen, K. and Gorospe, M., 2018. *Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs*, Wiley Interdiscip Rev RNA, 9(3), pp. e1471.
11. Schaftenaar, F., Frodermann, V., Kuiper, J. and Lutgens, E., 2016. *Atherosclerosis: the interplay between lipids and immune cells*, Curr Opin Lipidol, 27(3), pp. 209-15.
12. Vogiatzi, G., Oikonomou, E., Deftereos, S., Siasos, G. and Tousoulis, D., 2018. *Peripheral artery disease: a micro-RNA-related condition?*, Curr Opin Pharmacol, 39, pp. 105-112.
13. Zhang, P., Wu, W., Chen, Q. and Chen, M., 2019. *Non-Coding RNAs and their Integrated Networks*, J Integr Bioinform, 16(3).

EFICIENȚA ȘI DISEMINAREA CERCETĂRILOR

Lucrări publicate în reviste ISI – 6 autor principal

1. **Teodora Barbălată**, Mariana Deleanu, Mihaela Georgiana Cărnuță, Loredan Ștefan Niculescu, Mina Răileanu, Anca Volumnia Sima, Camelia Sorina Stancu. Hyperlipidemia Determines Dysfunctional HDL Production and Impedes Cholesterol Efflux in the Small Intestine: Alleviation by Ginger Extract, *Molecular Nutrition and Food Research* 63(19) :e1900029, **2019**. **DOI**: 10.1002/mnfr.201900029. **Factor de impact la momentul publicării (2019): 5,309 (Q1)**; factor de impact în 2022: 5,2 (Q1).
2. **Teodora Barbălată**, Lu Zhang, Mădălina D. Dulceanu, Camelia S. Stancu, Yvan Devaux, Anca V. Sima, Loredan S. Niculescu. Regulation of microRNAs in high-fat diet induced hyperlipidemic hamsters. *Scientific Reports* 10: 20549, **2019. DOI:** 10.1038/s41598-020-77539-4. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2020): 4,38 (Q1),** iar în anul 2022: 4,6 (Q2).
3. **Teodora Barbălată,** Oriana E. Moraru, Camelia S. Stancu, Yvan Devaux, Maya Simionescu, Anca V. Sima, Loredan S. Niculescu. miR-142 Levels in Plasma and Atherosclerotic Plaques from Peripheral Artery Disease Patients with Post-Surgery Cardiovascular Events. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 9600, **2020**. **DOI**: 10.3390/ijms21249600. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2020): 5,92 (Q1),** iar în anul 2022: 5,6 (Q1).
4. **Teodora Barbălată**, Oriana E. Moraru, Camelia S. Stancu, Anca V. Sima, Loredan S. Niculescu. MiR-223-3p levels in the plasma and atherosclerotic plaques are increased in aged patients with carotid artery stenosis; association with HDL-related proteins. *Molecular Biology Reports* 49(7):6779-6788, **2021**, **DOI**: 10.1007/s11033-021-06636-y. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2021): 2,742 (Q4),** iar în anul 2022: 2,8 (Q3).
5. **Teodora Barbălată**, Alina I. Scărlătescu, Gabriela M. Sanda, Laura Toma, Camelia S. Stancu, Maria Dorobanțu, Miruna M. Micheu, Anca V. Sima, Loredan S. Niculescu. Mitochondrial DNA Together with miR-142-3p in Plasma Can Predict Unfavorable Outcomes in Patients after Acute Myocardial Infarction. *International Journal of Molecular Sciences 23: 9947*, **2022. DOI**: 10.3390/ijms23179947. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2022): 5,6 (Q1).**
6. **Teodora Barbălată**, Loredan S. Niculescu, Camelia S. Stancu, Florence Pinet, Anca V. Sima. Elevated Levels of Circulating lncRNAs LIPCAR and MALAT1 Predict an Unfavorable Outcome in Acute Coronary Syndrome Patients. *International Journal of Molecular Sciences* 24(15):12076, **2023. DOI**: 10.3390/ijms241512076. **Factorul de impact al revistei în 2022: 5,6 (Q1).**

Lucrări publicate reviste ISI – 6 lucrări co-autor

1. Loredan S. Niculescu, Mădălina D. Dulceanu, Camelia S. Stancu, Mihaela G. Cărnuță, **Teodora Barbălată**, Anca V. Sima. Probiotics administration or the high-fat diet arrest

modulates microRNAs levels in hyperlipidemic hamsters. *Journal of Functional Foods* 56, 295-302, **2019. DOI:** 10.1016/j.jff.2019.03.036. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2019): 3,701 (Q1)**, iar în 2022: 5,6 (Q1).

2. Gabriela M. Sanda, Laura Toma, **Teodora Barbălată**, Oriana E. Moraru, Loredan S. Niculescu, Anca V. Sima, Camelia S. Stancu. Clusterin, paraoxonase 1, and myeloperoxidase alterations induce high-density lipoproteins dysfunction and contribute to peripheral artery disease; aggravation by type 2 diabetes mellitus. *BioFactors* 48(2): 454-468, **2021. DOI**: 10.1002/biof.1800. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2021): 6,438 (Q1)**, iar în anul 2022: 6,0 (Q1).
3. Laura Toma, **Teodora Barbălată**, Gabriela M. Sanda, Loredan S. Niculescu, Anca V. Sima, Camelia S. Stancu. CRISPR/dCas9 Transcriptional Activation of Endogenous Apolipoprotein AI and Paraoxonase 1 in Enterocytes Alleviates Endothelial Cell Dysfunction. *Biomolecules* 11, 1769, **2021**. **DOI**: 10.3390/biom11121769. **Factor de impact la momentul publicării (2021): 6,064 (Q2)**; factor de impact în 2022: 5,5 (Q1).
4. Alina Ioana Scărlătescu, **Teodora Barbălată**, Anca Volumnia Sima, Camelia Stancu, Loredan Ştefan Niculescu, Miruna Mihaela Micheu. miR-146a-5p, miR-223-3p and miR-142-3p as Potential Predictors of Major Adverse Cardiac Events in Young Patients with Acute ST Elevation Myocardial Infarction—Added Value over Left Ventricular Myocardial Work Indices D*iagnostics (Basel)* 12(8):1946, **2022. DOI**: 10.3390/diagnostics12081946. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2022): 3,6 (Q2).**
5. Mariana Deleanu., Laura Toma, Gabriela M. Sanda, **Teodora Barbalata**, Loredan S. Niculescu, Anca V. Sima, Călin Deleanu, Liviu Săcărescu, Alexandru Suciu, Georgeta Alexandru, Iuliana Crişan, Mariana Popescu, Camelia S. Stancu. Formulation of Phytosomes with Extracts of Ginger Rhizomes and Rosehips with Improved Bioavailability, Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects In Vivo**.** *Pharmaceutics* 15 (4): 1066, **2023**, **DOI**: 10.3390/pharmaceutics15041066. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2023): 5,4 (Q1).**
6. Korina Karagianni, Alessia Bibi, Alisia Madé, Shubhra Acharya, Mikko Parkkonen, **Teodora Barbalata**, Prashant K. Srivastava, David de Gonzalo-Calvo, Constanza Emanueli, Fabio Martelli, Yvan Devaux, Dimitra Dafou, A. Yaël Nossent, and on behalf of EU-CardioRNA COST Action CA17129. Recommendations for detection, validation, and evaluation of RNA editing events in cardiovascular and neurological/neurodegenerative diseases. *Molecular Therapy Nucleic Acids* 35 (1) **2023. DOI:** 10.1016/j.omtn.2023.102085. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2023): 8,8 (Q1).**

Premii câştigate

1. **Premiul "Best Poster Award"** pentru lucrarea: **Barbalata T**, Oriana E. Moraru, Loredan S. Niculescu, Camelia S. Stancu, Maya Simionescu, Anca V. Sima. A panel of circulating miRNAs could predict age-related post-endarterectomy cardiovascular events in carotid artery stenosis patients. Prezentare în cadrul celei de-a 4-a Întâlniri "MC and WG Meeting of COST Action

CA17129 “Catalysing transcriptomics research in cardiovascular disease”. 12-14 Februarie 2020, Maastricht, Olanda.

2. **Premiul pentru cel mai bun poster** pentru lucrarea: **Barbalata T**., Niculescu L.S., Stancu C.S., Pinet F., Sima A.V. LIPCAR and MALAT1, two long non-coding RNAs, are increased in the plasma acute coronary syndrome patients and predict major adverse cardiovascular events. Conferința Societății Române de Biologie Celulară (SRBC), 16-17 Noiembrie 2023, București, România.

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale: 5 comunicări

1. **Barbălată Teodora**. Prezentare orală în cadrul Simpozionului Internațional Acad. N. Cajal. Hyperlipidemia induces the production of dysfunctional HDL in the small intestine and liver of hamsters, and increases hepatic lipid-related miRNAs. 17-19 Octombrie **2019**, București, România.
2. **Barbălată Teodora**. Prezentare orală în cadrul Conferinței online CardioRNA Live! a acțiunii COST CA17129 “Catalysing transcriptomics research in cardiovascular disease”. A panel of miRNAs and inflammatory markers are associated with hyperglycemia in peripheral artery diseases patients. 7-10 Septembrie **2020**.
3. **Barbălată Teodora**. Prezentare orală în cadrul Conferinței Societății Române de Biologie Celulară (SRBC). MicroRNAs profiling in the heart and liver of high-fat diet induced hyperlipidemic hamster. 4-6 Noimebrie **2021,** București, România
4. **Barbălată Teodora**. Prezentare orală în cadrul “8th MC and WG Meeting of COST Action CA17129 “Catalysing transcriptomics research in cardiovascular disease”. Analysis of long non-coding RNAs (LIPCAR) distribution in human blood compartments. 25-27 Mai **2022**, Pavia. Italia
5. **Barbălată Teodora.** Prezentare orală în cadrul Simpozionului Științific Anual „Institute of Cellular Biology and Pathology Nicolae Simionescu. Increased plasma levels of miR-142-3p and mitochondrial DNA predict unfavorable outcomes in patients after acute myocardial infarction. 8-9 Decembrie **2022**, București, România.

Brevete înregistrate

Aplicație de patent nr. a 2022 00502, cu data de depozit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci (OSIM) 18/08/2022 și titlul “Fitozomi cu compuși biologic activi din rizomi de ghimbir și fructe de măceș cu biodisponibilitate crescută și procedeu de obținere”, autori: Deleanu M., Toma L., Sanda G.M., Niculescu L.S., **Barbalata T.**, Suciu A., Alexandru G., Crisan I., Popescu M., Stancu C.S.

COLABORĂRI ÎN PROIECTE DE CERCETARE

1. **PNRR-III-C9-2022-I8 –** ”Creșterea potențialului endogen antioxidant și de eflux al colesterolului prin editare genică în boala ficatului gras; studii preclinice (THERAGENLIV)”, director de proiect Dr. Shlomo Sasson

2. **PN-III-P4-PCE-2021-0831 –** ”Stimularea enzimelor antioxidante endogene prin editare genică cu CRISPR/dCas9, o abordare inovatoare pentru terapie complementară în bolile metabolice (OXIGENEDIT)”, director de proiect Dr. Camelia Sorina Stancu
3. **PN-III-P2-2.1-PED-2021-1929 –** ”Demonstrație experimentală a unei biotehnologii inovatoare care utilizează activarea transcripțională cu CRISPR/dCas9 pentru îmbunătățirea funcției HDL ca terapie în bolile cardiovasculare (CARDIOCRISPR)”, director de proiect Dr. Camelia Sorina Stancu
4. **PN-III-P2-2.1-PED-2019-1897 – ”**Validarea unui protocol de măsurare în plasmă a unui panel de markeri epigenetici (microARN) pentru prognosticul evoluției și personalizarea terapiei pacienților după infarctul miocardic acut (EPITERAMI)”, director de proiect Dr. Loredan Ștefan Niculescu
5. **PN-III-P2-2.1-PED-2019-3552 –** ”Dezvoltarea de nanofitozomi inovativi concepuți pentru administrare neinvazivă și cu biodisponibilitate crescută a unor compuși biologic activi cu proprietăți antioxidante și imunostimulatoare (NANOGINROSA)”, director de proiect Dr. Camelia Sorina Stancu
6. **PN-III-P1.1-TE-2019-2044 –** ”Peptide derivate din apolipoproteina A-II cu potențial terapeutic în ateroscleroză (A2A)”, director de proiect Dr. Violeta Truşcă (colaborator în echipa de implementare a proiectului în perioada 2022-2023)
7. **POC-A.1-A.1.1.4-E-2015 –** ”Îmbunătățirea competitivității instituționale în domeniul diabetului de tip 1 prin dezvoltarea unui concept inovator de imunoterapie cu celule stromale mezenchimale” director de proiect Dr. Nadir Askenasy (colaborator în echipa de implementare a proiectului în perioada 2019-2020)

ACADEMIA ROMÂNĂ
Şcoala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

EXPLORAREA CAPACITĂȚII SECRETOMULUI CELULELOR STROMALE MEZENCHIMALE COMBINAT CU NANO-BIOMATERIALE DE A CONTRIBUI LA DEZVOLTAREA UNOR TERAPII INOVATOARE ÎN MEDICINA REGENERATIVĂ

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
Acad. Maya SIMIONESCU

DOCTORAND:
Raluca Țuțuianu

Bucureşti
2021

Cuvinte cheie: celule stromale mezenchimale, nanoparticule, keratinocite, fibroblaste dermale, matrice tridimensională, secretom, exosomi, răni cutanate, angiogeneză

Număr total de pagini: 221

Număr de figuri în Partea I: 7

Număr de tabele în Partea I: 7

Număr de figuri în Partea a II-a: 89

Număr de tabele în Partea a II-a: 4

Referințe bibliografice: 441

Lucrări publicate în reviste indexate ISI: 10 (4 – autor principal)

Recenzii publicate în reviste indexate ISI: 2

Capitole carte: 1

Postere prezentate la manifestări ştiinţifice internaţionale: 3

Comunicări orale susținute la manifestări ştiinţifice naţionale: 2

Premii naţionale: 2

Burse obținute pe durata programului doctoral: 1 (bursă doctorală de la Academia Română)

Participarea la proiecte de cercetare naţionale: 6

Specializări: 2

Brevete: 1 aprobat și 1 depus

CUPRINS

LISTA ABREVIERILOR 1

INTRODUCERE ȘI OBIECTIVELE GENERALE ALE TEZEI 3

PARTEA I- STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTINȚELOR 6

I.1. CELULELE STROMALE MEZENCHIMALE DERIVATE DIN MADUVĂ OSOASĂ ȘI ȚESUT ADIPOS, ȘI IMPLICAREA ACESTORA ÎN REGENERAREA CUTANATĂ 6

I.1.1. Caracteristicile celulelor stromale mezenchimale derivate din maduvă osoasă și țesut adipos 6

I.1.2. Potentialul terapeutic al celulelor stromale mezenchimale derivate din maduvă osoasă și țesut adipos 8

I.2. PROCESUL DE VINDECARE AL RĂNILOR CUTANATE 14

I.2.1. Structura pielii 14

I.2.2. Etapele vindecarii rănilor cutanate 25

I.3. APLICAŢIILE NANOPARTICULELOR ŞI BIOMATERIALELOR ÎN REGENERAREA TISULARĂ 31

I.3.1. Nanoparticule pe bază de fier 31

I.3.2. Nanoparticule pe bază de argint 35

I.3.3. Substituenți cutanați pe bază de biomateriale 40

I.4. CONTRIBUȚIA SECRETOMULUI CELULELOR STROMALE MEZENCHIMALE ADULTE ÎN REGENERAREA CUTANATĂ 47

I.5. EXOSOMII SECRETAȚI DE CELULELE STROMALE MEZENCHIMALE DERIVATE DIN MADUVĂ OSOASĂ ȘI ȚESUT ADIPOS PENTRU REGENERAREA CUTANATĂ 51

I.5.1. Biogeneza și compoziția exosomilor 53

I.5.2. Metode de izolare a exosomilor 57

I.5.3. Tehnici de cuantificare și caracterizare a exosomilor 61

I.5.4. Efectele exosomilor secretați de celule stromale mezenchimale asupra procesului de vindecare a rănilor cutanate 64

PARTEA A II-A: CONTRIBUȚII ORIGINALE 75

II.1. POTENŢIALUL TERAPEUTIC AL NANOPARTICULELOR PE BAZĂ DE FIER CA VECTORI PENTRU ELIBERAREA CONTROLATĂ DE PRINCIPII ACTIVE 75

II.1.1. Introducere şi obiective 75

II.1.2. Materiale şi metode 76

II.1.2.1. Sinteza şi caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor hibride Fe-PEI 76
II.1.2.2. Linii celulare 78
II.1.2.3. Coloraţia Albastru de Prusia pentru evidențierea fierului 78
II.1.2.4. Interacțiunea NP Fe-PEI marcate fluorescent cu MSC 79
II.1.2.5. Imagistică de bioluminiscență pe celule în cultură 79
II.1.2.6. Microscopia electronică de trasmisie (TEM) 80
II.1.2.7. Măsurarea potențialului membranar mitocondrial (ΔΨm) 80
II.1.2.8. Determinarea dimensiunii agregatelor de nanoporticule 80
II.1.2.9. Evaluarea biocompatibilității NP Fe PEI cu aparatul xCellIgence 81
II.1.2.10. Testul de hemoliză 81
II.1.2.11. Evaluarea *in vivo* pe un model de xenografă heterotopică de glioblastom pe șoareci imunodeficienți 81
II.1.3. Rezultate 82
II.1.3.1. Selecția și caracterizarea fizico-chimică a NP Fe-PEI 82
II.1.3.2. Agregarea NP Fe-PEI în mediul de cultură 86
II.1.3.3. NP Fe-PEI cu DiI încorporat în timpul agregării sunt capabile să elibereze fluorocromul prin contact direct cu celulele 88
II.1.3.4. NP Fe-PEI cu substante încorporate în timpul agregarii sunt capabile sa le elibereze prin contact direct cu celulele 90
II.1.3.5. Încorporarea de cisplatină în NP Fe-PEI în timpul sintezei hidrotermale este asociată cu o eficienţă crescută a medicamentului 91
II.1.4. Discutii şi concluzii parţiale 96
II.2. POTENŢIALUL SECRETOMULUI DERIVAT DIN CELULE STROMALE MEZENCHIMALE UMANE ÎN VEDEREA DEZVOLTĂRII DE TERAPII PENTRU VINDECAREA RĂNILOR CUTANATE 99
II.2.1. Introducere şi obiective 99
II.2.2. Materiale şi metode 99
II.2.2.1. Sinteza şi caracterizarea matricei de colagen tridimensionale 99
II.2.2.2. Tehnici de culturi celulare 100
II.2.2.3. Caracterizarea MSC prin citometrie de flux 101
II.3.2.4. Caracterizarea fibroblastelor dermale umane prin imunocitochimie 101
II.2.2.5. Evaluarea capacităţii matricelor de colagen de a fi colonizate cu keratinocite şi fibroblaste umane 101

II.2.2.6. Evaluarea calitativă a viabilităţii keratinocitelor şi fibroblastelor umane cultivate pe matrici de colagen 102

II.2.2.7. Evaluarea efectului secretomului asupra aderării şi proliferarii keratinocitelor şi fibroblastelor umane cultivate în sistem 2D şi pe matricile 3D de colagen 102

II.2.2.8. Evaluarea capacităţii de migrare prin metoda "scratch test" 103

II.2.2.9. Evaluarea expresiei genice folosind tehnica PCR cantitativ în timp real (qPCR) 103

II.2.2.10 Testarea efectului chemo-atractant al secretomului 104

II.2.2.11. Evaluarea profilului citokinelor de la nivelul secretomului 104

II.2.2.11. Analiza statistică 104

II.2.3. Rezultate 105

II.2.3.1. Caracterizarea MSC derivate din maduvă osoasă şi a fibroblastelor izolate din derm 105

II.2.3.2. Matricea de colagen poroasă permite colonizarea cu keratinocite și fibroblaste 106

II.2.3.3. Secretomul influențează proprietățile keratinocitelor și fibroblastelor în sistemul clasic 2D de cultură 110

II.2.3.4. Secretomul promovează colonizarea matricelor de colagen cu keratinocite și fibroblaste 114

II.2.3.5. Secretomul prezintă proprietăți pro-angiogene și conține factori mito- și motogeni, precum și modulatori ai angiogenezei 118

II.2.4. Discutii şi concluzii parţiale 120

II.3. POTENȚIALUL TERAPEUTIC AL NANOPARTICULELOR PE BAZĂ DE ARGINT (NP AG) PENTRU TRATAMENTUL RĂNILOR CUTANATE 123

II.3.1. Introducere și obiective 123

II.3.2. Materiale și metode 123

II.3.2.1. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor hibride pe bază de argint 123

II.3.2.2. Linii celulare 124

II.3.2.3. Evaluarea viabilităţii celulare 124

II.3.2.4. Evaluarea capacităţii de migrare prin metoda "scratch test" 125

II.3.2.5. Evaluarea efectului apoptotic indus de NP Ag 125

II.3.2.6. Marcare fluorescentă a actinei filamentoase 125

II.3.2.7. Formarea de tubi pe GELTREX 125

II.3.2.8. Testarea microbiologică- metoda microdiluţiilor binare în bulion 126

II.3.3. Rezultate 126

II.3.3.1. Caracterizarea fizico-chimică a NP Ag 126

II.3.3.2. Evaluarea citotoxicității NP Ag pe keratinocite, fibroblaste şi celule endoteliale 128

II.3.3.3. Evaluarea efectelor NP Ag asupra migrării keratinocitelor, fibroblastelor şi celulelor endoteliale 133

II.3.3.4. Evaluarea efectelor NP Ag asupra citoscheletului actinic de la nivelul keratinocitelor, fibroblastelor şi celulelor endoteliale 136

II.3.3.5. Evaluarea efectelor NP Ag asupra procesului de angiogeneză 139

II.3.3.6. Evaluarea efectelor antibacteriene ale NP Ag 141

II.3.4. Discuții și concluzii parțiale 141

II.4. EVALUAREA EFECTELOR EXOSOMILOR ELIBERAŢI DE CELULE STROMALE MEZENCHIMALE ASUPRA CELULELOR PIELII, ÎN VEDEREA DEZVOLTĂRII UNUI TRATAMENT PENTRU VINDECAREA RĂNILOR CUTANATE 145

II.4.1. Introducere şi obiective 145

II.4.2. Materiale și metode 146

II.4.2.1. Izolarea și caracterizarea celulelor stromale mezenchimale din țesut adipos subcutan (ADSC) 146

II.4.2.3. Izolarea și caracterizarea exosomilor 146

II.4.2.3. Testarea funcțională comparativă a exosomilor în vederea selecției unei surse adecvate prin tehnica „scratch test 148

II.4.2.4. Evaluarea viabilității și proliferarii celulare 149

II.4.2.5. Preluarea exosomilor de către fibroblaste 149

II.4.2.6. Imunocito- și imunohistochimie 150

II.4.2.7. Tehnica PCR cantitativ (qPCR) 150

II.4.2.8. Western blot 151

II.4.2.9. Tehnica contracției gelului de colagen 151

II.4.2.10. Cuantificarea nivelului de TNFα prin tehnica ELISA 152

II.4.2.11. Formarea de tubi pe matrice extracelulară 152

II.4.2.12. Modelul de cultură organotipică cutanată (OTC) 152

II.4.2.13. Analiza αSMA prin citometrie de flux 153

II.4.2.14. Caracterizarea și testarea funcțională a gelului de fibrina cu nanoparticule și exosomi 153
II.4.2.15. Analiza statistică 153
II.4.3. Rezultate **154**
II.4.3.1. Caractarizarea celulelor stromale mezenchimale izolate din țesut adipos și maduvă osoasă 154
II.4.3.2. Caracterizarea exosomilor izolați prin ultracentrifugare 155
II.4.3.3. Testarea funcțională comparativă a exosomilor în vederea selecției unei surse adecvate 158
II.4.3.4. Efectele biologice ale exosomilor secretați de BM-MSC asupra principalelor celule implicate în vindecarea rănilor cutanate 160
II.4.4. Discuții și concluzii parțiale **178**
CONCLUZII GENERALE **184**
BIBLIOGRAFIE **186**
LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ŞI COMUNICATE **218**
BREVETE **220**
SPECIALIZĂRI ŞI CURSURI EFECTUATE **220**
BURSE OBȚINUTE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL ȘI FINANȚAREA CERCETĂRILOR **221**

Introducere și obiectivele generale ale tezei

Medicină regenerativă, reprezintă una din ramurile medicinei dezvoltate în vederea îmbunătățirii calității vieții pacienților. Conform unei definiții din 2006, acest domeniu interdisciplinar utilizează diverse abordări tehnologice cum ar fi: administrarea de molecule solubile, terapia genică, transplantul de celule stem, reprogramarea celulară și mai ales, ingineria tisulară [Greenwood et al. 2006]. Johnson et al au efectuat o analiză a categoriile de activități privind cele mai bune abordări din domeniu, concluzionând că este necesară înțelegerea și controlul angiogenezei, alături de răspunsul imun al organismului, a comportamentului celulelor stem și standardizarea utilizării acestora, precum și capacitatea de producerea în masă a construcților de inginerie tisulară rezultați [Johnson et al. 2007]. Astfel, sinergia unor discipline de bază cum ar fi: biologia celulară și știință materialelor au generat sisteme complexe tri-dimensionale (3D) celule-biomaterial, implantatabile cu scopul de a regenera țesutul, dar și sisteme exclusiv celulare, cum ar fi transplantul de celulele stem, sau bazate exclusiv pe biomateriale, care în urmă implantării se integrează la nivelul organismului [Muzzio et al. 2021].

Unul din principalii piloni care au susținut dezvoltarea domeniului medicinei regenerative, inclusiv a ingineriei tisulare, a fost stabilit acum mai bine de 50 de ani, când Friedenstein et al. au raportat izolarea unei populații clonogene, multipotente, fibroblastoide, derivate din măduvă osoasă [Friedenstein et al. 1968]. Ulterior, aceste celule stromale mezenchimale (MSC), considerate celule multipotente ușor accesibile, au fost izolate din diverse țesuturi umane adulte cum ar fi țesut adipos, sau prenatale: cordon umbilical, fluid amniotic. MSC au fost evaluate în studii clinice sub formă de terapie celulară pentru diferite patologii: precum infarctul miocardic acut, scleroza multiplă sau forma acută a bolii grefă versus gazdă rezistentă la steroizi [NCT00877903, NCT02239393, NCT02923375]. În ciuda potențialului de diferențiere observat *in vitro*, efectele benefice obținute în urma administrării de MSC nu au fost asociate cu grefarea acestor celule sau modificarea fenotipului către unul specific țesutului țintit. Mai mult, deși studiile preclinice au evidențiat rezultate promițătoare, efectele terapeutice nu au fost reproduse și în cadrul studiilor clinice; de altfel, în Europa prima autorizație de punere pe piață pentru un produs pe bază de MSC, s-a obținut abia în 2018 [Galipeau și Sensebe, 2018]. În același timp, secretomul MSC, constituit din totalitatea factorilor solubili (chemokine, citokine, factori de creștere) și veziculele extracelulare (microvesicule, exosomi) eliberate în mediul extracelular, s-a evidentiat ca efector paracrin pentru acțiunea benefică observată în cazul administrării acestor celule, conturându-se astfel o nouă abordare terapeutică „cell-free" [Praveen Kumar et al. 2019].

Pe de altă parte, domeniul științei materialelor s-a axat pe dezvoltarea unor compuși care să fie complementari acțiunii MSC. Mai exact, pornind de la matricea extracelulară ca model pentru fabricarea biomaterialelor, s-au propus diverși suporți tridimensionali („scaffolds") care să sprijine proliferarea și diferențierea celulelor cu scopul de a promova regenerarea tisulară. În general, pentru țesuturile moi s-au utilizat polimeri precum colagenul, alginatul, proteoglicanii,

chitosanul, datorită biocompatibilității și acțiunii bioactive ce permite aderarea și creșterea celulelor la nivelul lor. Totodată, domeniul nanomaterialelor a contribuit la dezvoltarea domeniului medicinei regenerative, mai exact prin varietatea nanoparticulelor (NP) ce pot fi utilizate fie ca vectori pentru eliberarea de principii active, fie ca agenți antibacterieni care să asigure siguranța utilizării biomaterialelor, prevenind infecțiile locale [Hasan et al. 2018].

În lucrarea de față au fost propuse următoarele obiective:

1. evaluarea unor nanoparticule superparamagnetice pe bază de fier și polietilenimina (NP Fe-PEI) obținute printr-o metodă de sinteză blândă, care să permită simultan încorporarea de agenți terapeutici cu prezervarea acțiunii lor, în scopul de a valida utilizarea acestor nanoparticule ca vectori pentru eliberarea de principii active;
2. investigarea capacității secretomului celulelor stromale mezenchimale umane, de a îmbunătăți performanțele *in vitro* ale unei matrice de colagen poroase utilizate în vindecarea rănilor cutanate;
3. selecția unor nanoparticule cu efecte antibacteriene pe bază de argint și polimeri, în funcție de acțiunea lor biologică asupra principalelor tipuri celulare implicate în vindecarea leziunilor pielii: keratinocite, fibroblaste dermale și celule endoteliale;
4. selecția exosomilor secretați de MSC izolate din două surse: măduva osoasă și țesut adipos, în vederea validării acestora *in vitro* ca agenți terapeutici activi capabili să stimuleze regenerarea cutanată prin acțiunea lor asupra principalelor etape din vindecarea rănilor cutanate.

Structura tezei de doctorat

Lucrarea este structurată în doua părți: **prima parte-** Stadiul actual al cunoștințelor- divizat în cinci capitole ce prezintă principalele caracteristici ale celulelor stromale mezenchimale și potențialul lor terapeutic, structura pielii şi etapele vindecării leziunilor cutanate, urmate de aspecte legate de aplicațiile nanoparticulelor, biomaterialelor precum și a secretomului pentru regenerarea cutanată. Ultimul capitol este dedicat exosomilor, conținând aspecte generale privind originea, izolarea și caracterizarea acestora, concentrându-se apoi pe cei secretați de MSC ca agenți terapeutici pentru vindecarea rănilor pielii**. Partea a doua** a lucrării include contribuțiile originale, organizate în patru capitole, corespunzătoare studiilor desfășurate pentru atingerea obiectivelor tezei.

Primul studiu- *Potenţialul terapeutic al nanoparticulelor pe bază de fier ca vectori pentru eliberarea controlată de principii active*, a presupus investigarea biocompatibilitatii unor nanoparticule superparamagnetice hibride pe baza de fier si polietilenimina (NP Fe-PEI) atât pe celule umane normale cât și tumorale, a capacității acestor nanoparticule de a încorpora principii active în urmă agregării în mediu de cultură și ulterior de a elibera substanță prin contact cu

celulele, precum și a efectului anti-tumoral al nanoparticulelor Fe-PEI cu cisplatina încorporată în timpul sintezei hidrotermale, pe modele *in vitro* și *in vivo.*

Principalele rezultate originale (Fig. 1):

1. nanoparticulele hibride cu un raport masic Fe:PEI de 1:2 obținute prin sinteză hidrotermală la 100 atm și 40°C și resuspendate într-o soluție de NaCl în prezența de PAA (acid poliacrilic) pentru stabilizare, au fost asociate cu o lipsă de toxicitate pe celulele stromale mezenchimale (MSC) murine la aceleași concentrații însă manifestând un efect citotoxic pe celulele tumorale de glioblastom (linia U87);

2. nanoparticulele hibride Fe:PEI au agregat spontan în mediu de cultură, iar agregatele astfel formate au încorporat substanțe active (DiI, valinomicina) prezente în soluție, pe care apoi le-au eliberat prin contact direct cu celula, activitatea biologică a substanțelor fiind prezervată;

3. nanoparticulele hibride Fe-PEI cu cisplatină încorporată în timpul sintezei au prezentat o acțiune anti-tumorală mai puternică comparativ cu medicamentul administrat ca atare la aceeași concentrație sau cu nanoparticulele cu cisplatina adăugată după sinteză atât *in vitro* pe linia U87 cât și *in vivo* pe modelul murin de xenografă heterotopică de glioblastom.

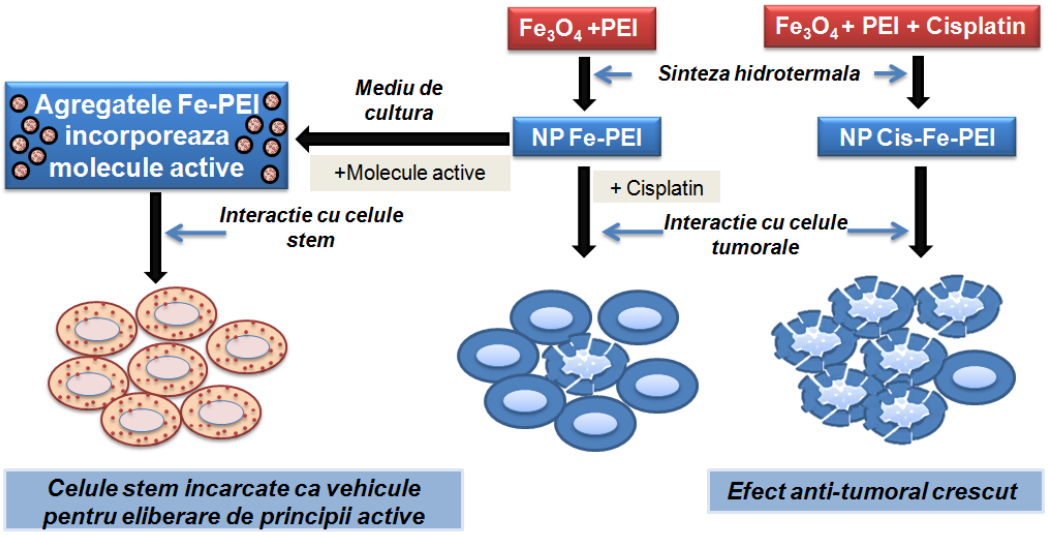


Figura 1. Reprezentare schematică sumarizând rezultatele prezentate în primul studiu privind potențialul terapeutic al nanoparticulelor hibride Fe-PEI. Rezultatele prezentate în acest capitol indică faptul că NP Fe-PEI au încorporat molecule active prin incubarea în mediu de cultură, şi au eliberat ulterior aceste substanţe prin contact direct cu celulele stem mezenchimale. De asemenea, nanoparticulele cu cisplatină încorporată în timpul sintezei, au prezentat un efect

anti-tumoral mult mai puternic comparativ cu nanoparticulele la care s-a adăugat cisplatină în aceeaşi concentraţie după sinteză.

În cadrul celui de-**al doilea studiu**- *Potenţialul secretomului derivat din celule stromale mezenchimale umane în vederea dezvoltării de terapii pentru vindecarea rănilor cutanate*, s-a evaluat îmbunătățirea adusă unei matrici poroase de colagen bovin de tip I prin adiția unui agent trofic potent- secretomul derivat de la celule stromale mezenchimale (MSC) umane sub formă de mediu condiționat, în ceea ce privește colonizarea cu keratinocite și fibroblaste dermale umane, precum și efectul secretomului asupra proliferării, migrării celulare și angiogenezei *in vitro*.

Principalele rezultate originale (Fig. 2):

1. secretomul MSC a promovat colonizarea matricei de colagen cu keratinocite și fibroblaste, prin stimularea aderării și proliferării acestora;

2. secretomul MSC a modificat expresia genică a moleculelor implicate în sinteză și degradarea matricei extracelulare (colagen de tip I si III, αSMA, TIMP-1, TIMP-2, MMP-9);

3. secretomul MSC a prezentat proprietăți pro-angiogene, fiind motogen și chemo-atractant pentru celulele endoteliale.

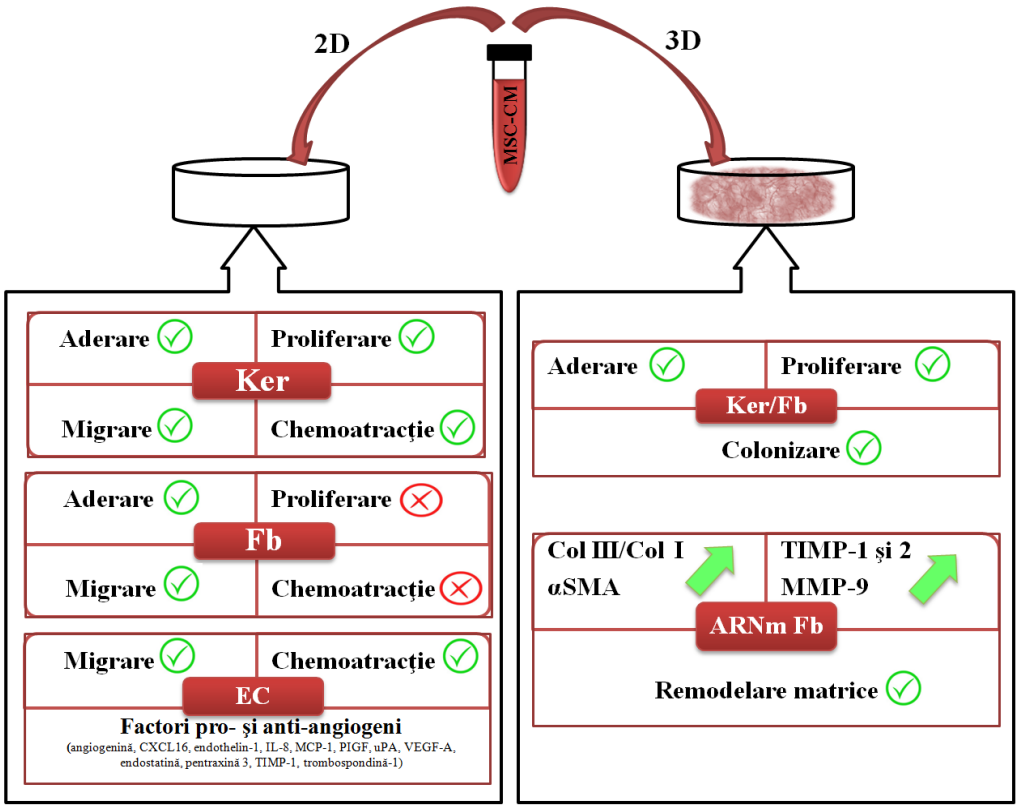


Figura 2. Reprezentare schematică sumarizând rezultatele prezentate cel de-al doilea studiu privind potențialului terapeutic al secretomului derivat de la celulele stromale mezenchimale izolate din măduvă osoasă combinat cu o matrice poroasă de colagen pentru tratamentul leziunilor cutanate.

Cel de-al treilea studiu inclus în teza de doctorat, se referă la selecția unor nanoparticule de argint (NP Ag), în vederea utilizării acestora ca agenți antibacterieni pentru încorporarea într-un compus pe bază de gel de fibrină pentru tratamentul rănilor cutanate. Alegerea NP Ag adecvate a fost fundamentată de o serie de experimente, care pe lângă efectul citotoxic asupra viabilității keratinocitelor, fibroblastelor dermale și celulelor endoteliale, a urmărit și migrarea celulară și dispunerea citoscheletului actinic, alături de acțiunea antibacteriană.

Principalele rezultate originale (Fig. 3) :

1. concentrația maximă de nanoparticule pentru care viabilitatea celulară a keratinocitelor nu a scăzut față de control a fost de 40 µg/ml pentru NP Ag EG și EG/PVP, 25 µg/ml pentru NP Ag PEG și respectiv, 30 µg/ml pentru NP Ag PEG PVP;

2. concentrația maximă de nanoparticule pentru care viabilitatea celulară a fibroblastelor și celulelor endoteliale nu a scăzut față de control a fost de 30 µg/ml pentru NP Ag EG și EG/PVP, 20 µg/ml pentru NP Ag PEG și respectiv, 25 µg/ml pentru NP Ag PEG PVP;

3. concentrația maximă de NP Ag care nu a afectat migrarea celulară a fost de 25 µg/ml pentru NP Ag EG și EG/PVP, și de 10 µg/ml în cazul NP Ag PEG si PEG/PVP, iar prezența NP Ag a indus o creștere a densității fibrelor de stres de actină.

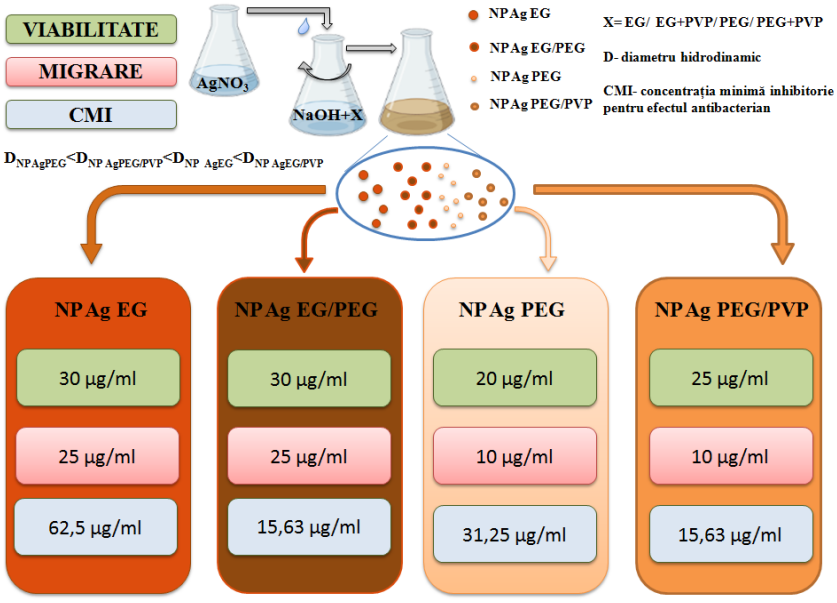


Figura 3. Reprezentare schematică a principalelor rezultate prezentate în cel de-al treilea studiu privind activitatea biologică a nanoparticulelor pe bază de argint sintetizate prin metoda

chimică, ce presupune reducerea alcalină a azotatului de argint, și funcționalizate cu etilen glicol (EG), polietilenglicol (PEG), cu sau fără polivinilpirolidonă (PVP). Dintre cele patru tipuri de nanoparticule studiate din punct de vedere al viabilitatii,capacitatii de a interfera cu migrarea celulară si a valorilor concentrației minime inhibitorii pentru acțiunea bacteriostatică, rezultatele au susținut utilizarea NP Ag EG/PVP până la concentrații de 25 µg/ml, fără a compromite viabilitatea și motilitatea keratinocitelor, fibroblastelor dermale și a celulelor endoteliale, fiind în același timp eficiente împotriva bacteriilor frecvent întâlnite în infecțile cutanate.

Cel de-al patrulea studiu din partea de contributii originale, s-a concentrat pe exosomii secretati de MSC, inițial alegându-se sursa cea mai adecvată: MSC izolate din țesut adipos (ADSC) sau măduva osoasă (BM-MSC). Exosomii astfel selectați au fost evaluați din punct de vedere al acțiunii stimulante asupra proliferării și migrării celulare, angiogenezei, a modificării expresiei genice și proteice în cadrul diferențierii fibroblastelor către miofibroblaste, și a capacității de a promova re-epitelizarea unei răni complete efectuate pe un model de cultură organotipica cutanata umană.

Modelul de cultura organotipica umana dezvoltat in cadrul programului de pregatire doctorala, reprezinta o alternativa la studiile pe animale, care, in cazul ranilor pielii, isi pierd din relevanta pentru translatia spre faza clinica, din cauza diferentelor majore anatomice si fiziologice fata de om [Parnell et al 2019]. De altfel, un model similar este deja utilizat pentru testele standard de iritație ale pielii conform ISO 10993-23:2021-Partea 23.

Principalele rezultate originale (Fig. 4):

1. exosomii izolați prin centrifugare diferențială din mediul condiționat secretat de MSC derivate din maduvă osoasă, au stimulat proliferarea și migrarea keratinocitelor și fibroblastelor umane;

2. exosomii în interacție cu fibroblastele dermale, chiar și în cazul unui mediu bogat în TGFβ1, nu au indus un fenotip pro-fibrotic, ci unul pro-vindecare, caracterizat de o creștere a expresiei proteice pentru colagen de tip I, fibronectină, decorină, precum și de o îmbunătățire a capacității contractile, însoțită de o mărire a expresiei enzimei lizil oxidaza, și nu a proteinei αSMA;

3. exosomii au conținut factori cu acțiune atât pro- cât și anti-angiogenă: Ang-2, ET-1, EG-VEGF/PK1, persefină, uPA și, respectiv, TSP-1, TIMP-1, PEDF, PAI-1, iar aceste nanovezicule au stimulat migrarea și formarea de tubi a celulelor endoteliale;

4. exosomii au susținut procesul de re-epitelizare pe un model de cultură organotipică cutanată umană lezat pe toată grosimea, similar cu mediu control pozitiv suplimentat cu factori de creștere.

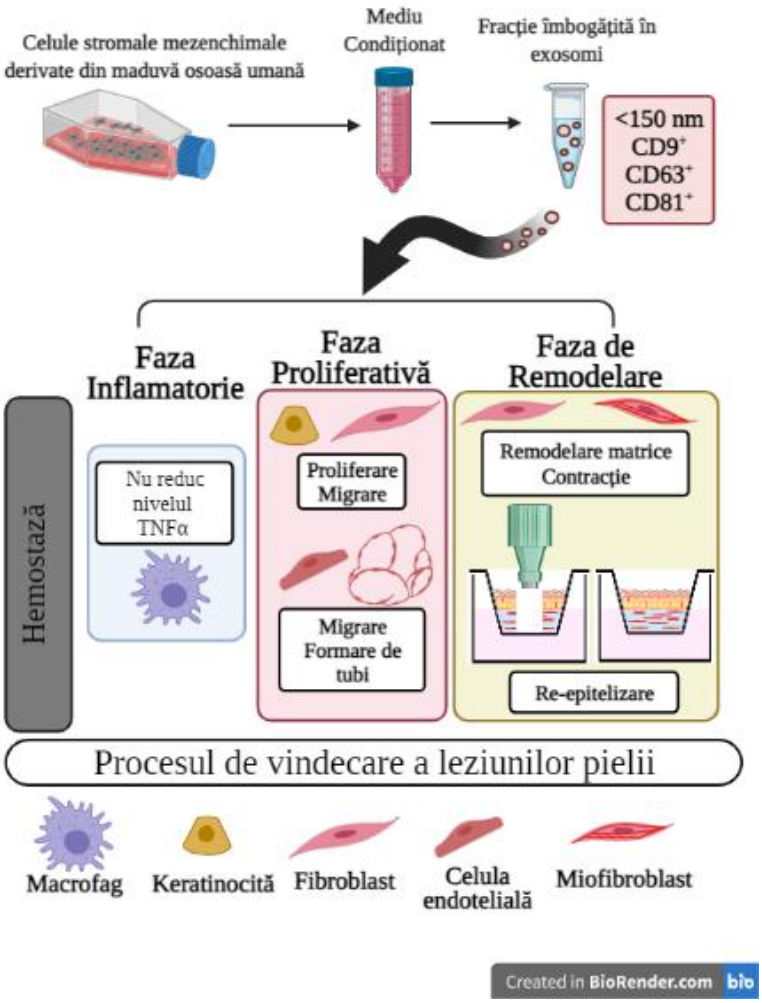


Figura 4. Reprezentare schematică sumarizând principalele rezultate din cel de-al patrulea studiu privind acțiunea exosomilor secretați de BM-MSC asupra principalelor tipuri celulare implicate în vindecarea rănilor cutanate [creat cu BioRender.com].

Astfel, în urma studiilor efectuate în cadrul programului de pregătire doctorală, s-au obținut următoarele rezultate originale:

1. Nanoparticulele superparamagnetice hibride pe bază de fier și poli(etilenimină), sintetizate prin metoda hidrotermală în condiții ce suportă în același timp încorporarea de principii active fără a compromite activitatea lor terapeutică, au fost biocompatibile atât pe celule normale cât și tumorale. Acest tip de nanoparticule au agregat spontan în mediu de cultură și permit astfel încorporarea de substanțe active în structurile micrometrice rezultate, pe care apoi le-au eliberat prin contact direct cu celulele. În cazul încorporării în timpul sintezei a unui compus anti-tumoral, precum cisplatina, la o concentrație fără efecte secundare, nanoparticulele au

prezentat un efect citotoxic asupra celulelor de glioblastom și o tendință de scădere a dimensiunii tumorii *in vivo*, susținând utilizarea lor ca vectori pentru eliberarea controlată.

2. Secretomul, sub formă de mediu condiționat, provenit de la celulele stromale mezenchimale (MSC) umane izolate din măduva osoasă, a avut efecte chemo-atractante și mitogene asupra keratinocitelor și celulelor endoteliale, cultivate în sistemul clasic bidimensional. Mai mult, acest secretom a promovat colonizarea matricelor tridimensionale poroase de colagen bovin de tip I cu keratinocite și fibroblaste dermale; de asemenea, prezența mediului condiționat a modulat expresia genică a moleculelor implicate în sinteză și degradarea matricei extracelulare (colagen de tip I și III, αSMA, TIMP1, TIMP2, MMP14). Astfel, datele obținute au susținut fezabilitatea combinării matricei de colagen cu secretomul derivat de la MSC în vederea utilizării sub forma unui produs acelular disponibil „direct de pe raft" pentru vindecarea rănilor cutanate.

3. Nanoparticulele de argint (NP Ag) funcționalizate cu etilen glicol, etilen glicol și poli(vinilpirolidonă), poli(etilenglicol), sau poli(etilenglicol) și poli(vinilpirolidonă) sintetizate prin metoda reducerii nitratului de argint, au prezentat nivele de citotoxicitate diferite pentru keratinocite, fibroblaste dermale și celule endoteliale; cea mai mare concentrație care nu a afectat viabiliatatea și capacitatea migratorie fiind înregistrată pentru NP Ag cu etilen glicol și poli(vinilpirolidonă)- 25 µg/ml, care, corelată cu concentrația minimă inhibitorie pentru efectul antibacterian- 15,63 µg/ml, a susținut utilizarea acestor nanoparticule pentru potențiale aplicații în cazul tratamentului leziunilor pielii.

4. Exosomii secretați de MSC izolate din măduva osoasă umană au avut un efect stimulator mai puternic asupra migrării keratinocitelor, comparativ cu cei secretati de MSC izolate din țesut adipos; acești exosomi selectați au promovat proliferarea keratinocitelor și fibroblastelor dermale, inducând un fenotip pro-vindecare la nivelul fibroblastelor diferențiate către miofibroblaste, caracterizat de o creștere a contractilitatii fără modificarea expresiei de αSMA. De asemenea, aceste nanovezicule au susținut migrarea celulelor endoteliale și formarea de tubi, sugerând o acțiune pro-angiogenă, datorată cel mai probabil citokinelor și factorilor de creștere identificați la nivelul acestora. Mai mult, tratarea cu exosomi a leziunilor efectuate pe culturilor organotipice cutanate umane, care mimează structura pielii, a fost asociată cu o re-epitelizare completă, sprijinind astfel aplicarea acestui tip de vezicule extracelulare pentru terapia rănilor tegumentului.

Referinte:

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation. 1968; 6(2):230-47.

Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. Cell Stem Cell. 2018; 22(6):824-833.

Greenwood HL, Singer PA, Downey GP, Martin DK, Thorsteinsdóttir H, Daar AS. Regenerative medicine and the developing world. PLoS Med. 2006; 3(9):e381.

Hasan A, Morshed M, Memic A, Hassan S, Webster TJ, Marei HE. Nanoparticles in tissue engineering: applications, challenges and prospects. Int J Nanomedicine 2018; 24(13):5637-5655.

Johnson PC, Mikos AG, Fisher JP, Jansen JA. Strategic directions in tissue engineering. Tissue Eng. 2007;13(12):2827-37.

Muzzio N, Moya S, Romero G. Multifunctional Scaffolds and Synergistic Strategies in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Pharmaceutics. 2021; 13(6):792.

Praveen Kumar L., Sangeetha K., Ranjita M., Vijayalakshmi S., Rajagopal K., Rama Shanker V. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. Cytokine Growth Factor Rev. 2019;46:1-9.

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ŞI COMUNICATE

LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE INDEXATE ISI- autor principal

1. **Tutuianu R**, Rosca AM, Iacomi DM, Simionescu M, Titorencu I. Human Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Promote In Vitro Wound Healing by Modulating the Biological Properties of Skin Keratinocytes and Fibroblasts and Stimulating Angiogenesis. Int J Mol Sci. **2021** Jun 9;22(12):6239. doi: 10.3390/ijms22126239. (factor de impact- 5,54; Q1).
2. **Tutuianu R**, Rosca AM, Albu Kaya MG, Pruna V, Neagu TP, Lascar I, Simionescu M, Titorencu I. Mesenchymal stromal cell-derived factors promote the colonization of collagen 3D scaffolds with human skin cells. J Cell Mol Med. **2020** Sep;24(17):9692-9704. doi: 10.1111/jcmm.15507. (factor de impact- 4,83; Q1).
3. **Tuţuianu R**, Roşca AM, Florea G, Prună V, Iacomi DM, Rădulescu LA, Neagu TP, Lascăr I, Titorencu ID. Heterogeneity of human fibroblasts isolated from hypertrophic scar. Rom J Morphol Embryol. **2019**;60(3):793-802. PMID: 31912089. (factor de impact- 1,38; Q4).

4. **Tutuianu R**, Popescu LM, Preda MB, Rosca AM, Piticescu RM, Burlacu A. Evaluation of the Ability of Nanostructured PEI-Coated Iron Oxide Nanoparticles to Incorporate Cisplatin during Synthesis. Nanomaterials (Basel). **2017** Oct 12;7(10):314. doi: 10.3390/nano7100314. (factor de impact- 3,5; Q1).

LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE INDEXATE ISI- co-autor

1. Mocioiu AM, **Tutuianu R**, Cursaru LM *et al.* 3D structures of hydroxyapatite obtained from *Rapana venosa* shells using hydrothermal synthesis followed by 3D printing. J. Mater. Sci. **2019**; 54**,** 13901–13913. https://doi.org/10.1007/s10853-019-03872-3. (factor de impact- 3,5; Q1)
2. Rosca AM, Mitroi DN, Cismasiu V, Badea R, Necula-Petrareanu G, Preda MB, Niculite C, **Tutuianu R,** Szedlacsek S, Burlacu A. Collagen regulates the ability of endothelial progenitor cells to protect hypoxic myocardium through a mechanism involving miR-377/VE-PTP axis. J Cell Mol Med. 2018 Oct;22(10):4700-4708. doi: 10.1111/jcmm.13712. (factor de impact- 4,6; Q1)
3. Odent Grigorescu G, Rosca AM, Preda MB, **Tutuianu R**, Simionescu M, Burlacu A. Synergic effects of VEGF-A and SDF-1 on the angiogenic properties of endothelial progenitor cells. J Tissue Eng Regen Med. 2017 Nov;11(11):3241-3252. doi: 10.1002/term.2233. (factor de impact- 4,6; Q2)
4. Gradinaru S, Popescu LM, Piticescu RM, Zurac S, Ciuluvica R, Burlacu A, **Tutuianu R**, Valsan SN, Motoc AM, Voinea LM. Repair of the Orbital Wall Fractures in Rabbit Animal Model Using Nanostructured Hydroxyapatite-Based Implant. Nanomaterials (Basel). **2016** Jan 7;6(1):11. doi: 10.3390/nano6010011. (factor de impact- 3,5; Q2)
5. Preda MB, Rosca AM, **Tutuianu R**, Burlacu A. Pre-stimulation with FGF-2 increases in vitro functional coupling of mesenchymal stem cells with cardiac cells. Biochem Biophys Res Commun. **2015** Aug 21;464(2):667-73. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.055. (factor de impact- 2,3; Q2)
6. Odent Grigorescu G, Preda MB, Radu E, Rosca AM, **Tutuianu R**, Mitroi DN, Simionescu M, Burlacu A. Combinatorial approach for improving the outcome of angiogenic therapy in ischemic tissues. Biomaterials. **2015** Aug;60:72-81. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.05.002. (factor de impact- 9,5; Q1)

RECENZII PUBLICATE ÎN REVISTE INDEXATE ISI

1. Roşca AM, **Ţuţuianu R**, Titorencu ID. Mesenchymal stromal cells derived exosomes as tools for chronic wound healing therapy. Rom J Morphol Embryol. 2018;59(3):655-662. PMID: 30534802. (factor de impact- 1,38; Q4)

2. Rosca AM, Rayia DM, **Tutuianu R**. Emerging Role of Stem Cells - Derived Exosomes as Valuable Tools for Cardiovascular Therapy. Curr Stem Cell Res Ther. 2017;12(2):134-138. doi: 10.2174/1574888X10666151026115320. PMID: 26496883. (factor de impact- 2,16; Q2)

COLABORATOR LA UN CAPITOL ÎNTR-O MONOGRAFIE PUBLICATĂ ÎN STRĂINĂTATE

Rosca AM, **Tutuianu R**, Titorencu I. 2020. Advances in skin regeneration and reconstruction in *Frontiers in Stem Cell and Regenerative Medicine Research*: *vol. 9*, (ed. Atta-ur-Rahman & Shazia Anjum), Bentham Science Publishers, pp. 143-187, ISBN (online): 978-68108-762-7.

COMUNICĂRI PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ŞTIINŢICE INTERNAŢIONALE

1. Tutuianu R, Rosca AM, Grumezescu AM, Stoica AE, Titorencu I. *In vitro assessment of the effects of silver based nanoparticles on human skin cells involved in the wound healing progress*, 6th Nano Boston Conference, 7-9 decembrie 2020, eveniment virtual, e-poster.
2. Tutuianu R, Rosca AM, Grumezescu AM, Stoica AE, Titorencu I. *Silver-based nanoparticles preserve the properties of keratinocytes and dermal fibroblast and can be safely used for skin wound healing*, The 37th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 11th National Congress with International Participation, 20-23 iunie 2018, Constanţa, România, Book of abstracts p.131 (poster)- premiul II sesiune postere
3. Tutuianu R, Rosca AM, Pruna V, Simionescu M, Titorencu I. *The potential of mesenchymal stromal cell secretome for enhancing the skin cells colonization of 3D collagen scaffolds*, The 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 10th National Congress with International Participation, 6-9 iunie 2018, Craiova, România, Book of abstracts p.37 (prezentare orală)
4. Tutuianu R, Rosca AM, Pruna V, Albu Kaya MG, Zamfirescu D, Titorencu I, Simionescu M. *Mesenchymal stem cells released factors sustain the population of collagen–alginate scaffolds with human skin cells for dermal reconstruction*, The 35th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 9th National Congress with International Participation, 7-11 iunie 2017, Iaşi, România, Book of abstracts p. 17 (prezentare orală)- premiul III la Minisimpozionul Doctoranzilor
5. Tutuianu R, Popescu M, Preda MB, Simionescu M, Piticescu R, Bulacu A. *Poly(ethylenimine)-coated iron oxide nanoparticles increase the efficiency of intracellular delivery of biologically active factors incorporated either during or after synthesis*, Conferinţă EMBO "The molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair", 17-21 septembrie 2016, Paestum, Italia, Book of abstracts p. 135 (poster)

BREVETE

- Depus spre aprobare OSIM: Simionescu M, Rosca AM, Titorencu ID, Iacomi MD, Tutuianu R, Pruna V, Lasca I, Chercherita IA, Neagu PT, Mogoanta L, Mogosanu GD, Pirici ND, Streba CT, Birca AC, Burdusel AC, Stoica AE, Grumezescu AL, Chircov C. HIDROGELURI POLIMERICE COMPOZITE CU PROPRIETĂȚI ANTIBACTERIENE ȘI CICATRIZANTE ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTORA, A/00370 din 25.06.2021
- Aprobat OSIM: Albu MG, Lascar I, Stancu IC, Titorencu I, Zamfirescu DG, Marin S, Lungu A, Nitipir C, Tutuianu R, Simionescu M. SUPORTURI POROASE STRATIFICATE, PENTRU TRATAMENT PERSONALIZAT AL RĂNILOR DIFICILE, ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTORA, RO-BOPI 3/2019, Nr. 133133.

SPECIALIZĂRI ŞI CURSURI EFECTUATE

1. Stagiu de pregatire privind izolarea şi caracterizarea exosomilor, coordonat de dr. Magdalena Lorenowicz, 31 iulie-18 august 2018, MSC Biology Group, University Medical Center Utrecht, Olanda

2. Curs internaţional "Techniques to validate the isolation of ADSC and their differentiation evaluation", The 2nd CONGRESS of ISRMS (International Society of Regenerative Medicine and Surgery), 14-16 iunie 2017, Bucureşti, România.

BURSE OBȚINUTE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL ȘI FINANȚAREA CERCETĂRILOR

Bursă de doctorat- Academia Română (SCOSAAR): 2014-2017

COLABORATOR ÎN GRANTURI NAŢIONALE– 6:

1. PROSKIN- Mesenchymal stromal cells contribution to the reepithelialization process of biomimetic skin cultures by differentiation and paracrine factors, PNIII TE 3/2018;
2. NANOLIFE-Bioactive Nanostructures for Innovative Therapeutic Strategies, PN III PCCDI 45/2018;
3. Zettaskin- Rational design and synthesis of bioactive smart scaffolds for the personalized treatment of acute and chronic wounds, PN II PCCA 201/2014
4. Osseopromote- Multifunctional coatings for load bearing implants made of a novel titanium-based alloy, PN II PCCA 212/2014
5. ComTIsM- Ischemic tissue engineering by combinatorial transplant: piecing together the puzzle to gain mutual benefits for graft survival and host tissue repair, PN II TE 83/2014;
6. THERION- Preclinical model of cell therapy employing protein tyrosine phosphatase-microRNA interplay to optimize neovascularization, PN II PCCA 79/2012.

Romanian Academy
School of Advanced Studies of the Romanian Academy
Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"

PhD THESIS SUMMARY

Vascular wall damage in atherosclerotic cardiovascular disease and cardiopulmonary disease: molecular mechanisms involved and effects of extracellular vesicles and siRNA-mediated therapy

SCIENTIFIC ADVISER:

PhD Habil, Principal Investigator Grade I ADRIANA GEORGESCU

PhD STUDENT:

IOANA-KARLA COMARIȚA

Bucharest

2025

TABLE OF CONTENTS

LIST OF ABBREVIATIONS…… 9

INTRODUCTION AND OBJECTIVES 13

I. STATE OF THE ART ON ATHEROSCLEROTIC CARDIOVASCULAR DISEASE AND CARDIOPULMONARY DISEASE… 19

1. CARDIOVASCULAR SYSTEM - ANATOMICAL, PHYSIOLOGICAL, AND HISTOLOGICAL ASPECTS 19

1.1. Main Components and Functions of the Cardiovascular System 19

1.2. Vascular System 20

1.2.1. Histological Structure of the Vascular Wall 21

1.3. Vascular Endothelium 24

1.3.1. Endothelial Cell: Definition and Composition 24

1.3.2. Functions of the Vascular Endothelium 27

1.3.2.1. Factors of Relaxation and Contraction 29

2. ATHEROSCLEROSIS 35

2.1. Atherosclerosis - Definition 35

2.2. Risk Factors of Atherosclerosis 35

2.2.1. Hypercholesterolemia 36

2.2.2. Hypertension 37

2.3. Endothelial Dysfunction 37

2.3.1. Renin-Angiotensin-Aldosterone System 38

2.3.1.1. **Atherogenic Effects of Angiotensin II** 39

2.3.2. Oxidative Stress 41

2.3.3. Inflammatory Markers 42

2.4. **Stages of Atherosclerosis Development** 44

2.4.1. Endothelial Activation and Initiation of Injury 44

2.4.2. Endothelial Cell Dysfunction and Foam Cell Formation 45

2.4.3. Inflammatory Process 46
2.4.4. Lipid Oxidation 46
2.4.5. Formation of Fibro-Lipid Plaques 47
2.4.6. Formation of the Necrotic Core and Thrombosis Development 47
2.4.7. Role of Immunity in Atherosclerosis 48
2.4.8. Hemodynamics in Atherosclerosis 50
2.5. Stages of Atherosclerotic Development from the Morphological Modifications Perspective…… 51
2.5.1. **Non-Atherosclerotic Intimal Lesions** 51
2.5.2. **Progressive Atherosclerotic Lesions** 51
2.5.3. Acute Lesions with Thrombus Formation 51
2.5.4. Lesions with Healed Thrombi 51
2.6. Mechanisms Involved in Atherosclerosis: Canonical and Non-canonical Signaling Pathways……. 52
2.6.1. TGF-β1 Signaling Pathway Receptors 53
2.6.2. **TGF-β1/Smad 2/3 Signaling Pathway** 54
2.6.3. TGF-β1/TAK1 Signaling Pathway 54
2.7. Genetic Factors Involved in Atherosclerosis Pathogenesis 56
2.7.1. Genes Involved in Endothelial Dysfunction 57
2.7.2. Genes Involved in Lipoprotein Metabolism 59
2.7.3. Genes Involved in Triglyceride Metabolism 63
2.7.4. Genes Involved in Inflammatory Processes and Cell Adhesion 63
2.7.5. Genes Involved in Oxidative Stress Production 65
2.7.6. Genes Involved in Vascular Remodeling 65
2.7.7. **Genes Involved in Apoptosis** 66
2.7.8. Genes Involved in Thrombosis 66
2.7.9. Genes Involved in Vascular Calcification 67

3. RESPIRATORY SYSTEM - ANATOMICAL, PHYSIOLOGICAL, AND HISTOLOGICAL ASPECTS 69
3.1. General Aspects 69
3.2. Intrapulmonary Airways 70

3.2.1. Respiratory Bronchiole 70
3.2.2. Alveolar Ducts 71
3.2.3. Alveolar Sacs 71
3.2.4. Pulmonary Alveoli 71
3.2.4.1. Type I Pneumocyte 72
3.2.4.2. Type II Pneumocyte 72
3.2.4.3. Alveolar Macrophages 73
3.2.4.4. Air-blood Barrier 73
3.3. The Lung 73

4. PULMONARY HYPERTENSION 75
4.1. Definition 75
4.2. Clinical Classification of Pulmonary Hypertension 75
4.3. Pulmonary Arterial Hypertension 76
4.3.1. Inflammation and Fibrosis in Pulmonary Arterial Hypertension 78
4.3.2. Oxidative Stress and Signaling Pathways Involved in Pulmonary Arterial Hypertension…. 80
4.4. Clinical Diagnosis and Disease Severity Evaluation 83
4.5. **Pharmacological Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension** 83
4.6. Role of MicroRNAs in Pulmonary Arterial Hypertension 84

5. EXTRACELLULAR VESICLES 85
5.1. Definition 85
5.2. Classification 85
5.3. Functions of Extracellular Vesicles 87
5.4. Microvesicles 87
5.5. Exosomes 88
5.6. Isolation Methods 90
5.7. Therapeutic Applications 92

6. UTILIZATION OF GENE THERAPIES IN CARDIOVASCULAR DISEASES…. 96

6.1. Discovery of MicroRNA Interference RNA 96
6.2. Mechanism of Action 96
6.3. Gene Therapies Based on MicroRNA Interference in Cardiovascular Diseases……..... 98

II. ORIGINAL CONTRIBUTIONS..... 101

STUDY I. VASCULAR WALL DAMAGE IN ATHEROSCLEROTIC CARDIOVASCULAR DISEASE; BENEFICIAL EFFECT OF EXTRACELLULAR VESICLE-BASED THERAPY ON ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND MOLECULAR MARKERS…..... 101

1. Introduction and Objectives 101

2. Materials and Methods 105
2.1. Murine Experimental Models with Atherosclerotic Cardiovascular Disease Induced by Atherogenic Diet Transplanted with EVs (ADSCs) or EVs (BM-MSCs), Transfected or Not with Smad2/3siRNA 106
2.2. **Isolation and Characterization of ADSCs and BM-MSCs** 108
2.3. **Isolation and Characterization of EVs (ADSCs) and EVs (BM-MSCs)** 111
2.4. Transfection of EVs with Smad2/3 siRNA 112
2.5. Biochemical Analysis of Plasma Parameters 113
2.6. Echocardiographic Evaluation of Arterial Wall Structure 114
2.7. Myographic Analysis of Functional Responses of Isolated Blood Vessels…..……..... 114
2.8. Plasma Levels of Ang II and TGF-β1 115
2.9. Immunofluorescence Labeling and Image Analysis for Detection of Inflammatory Markers……..... 116
2.10. Protein Expression Analysis by Western Blot 118
2.11. RNA Extraction and MicroRNA Quantification by RT-qPCR..... 120

3. Results..... 121

3.1. Characterization of ADSCs and BM-MSCs Revealed the Presence of Stem Cell-Specific Markers…… 121

3.2. Characterization of EVs from the Secretome of ADSCs or BM-MSCs Revealed the Presence of Both Microvesicles and Exosomes 124

3.3. Verification of Transfection Efficiency of EVs (ADSCs) and EVs (BM-MSCs) with Smad2/3 siRNA by Flow Cytometry 127

3.4. Effects of Diet and Atherogenic Treatment on Plasma Parameters 128

3.5. Echocardiographic Evaluation Highlighted Vascular Structural Changes and Blood Flow Alterations Induced by Atherogenic Diet; EV-Based Stem Cell Treatment Produced Significant Improvements. 131

3.6. Vascular Myography Revealed Altered Functional Responses of Blood Vessels After 4 Months of Atherogenic Diet; Favorable Effects of Treatment with EVs (ADSCs) or EVs (BM-MSCs) Transfected or Not with Smad2/3siRNA 140

3.7. **Increased Plasma Levels of TGF-β1 and Ang II in Atherosclerosis Were Reduced After Administration of EVs (ADSCs) or EVs (BM-MSCs) Transfected or Not with Smad2/3siRNA** 145

3.8. EVs (ADSCs) and EVs (BM-MSCs) Transfected or Not with Smad2/3siRNA Reduced the Expression of Inflammatory Markers in the Thoracic Aorta and Carotid Artery Wall Affected by Hyperlipidemia and Experimental Hypertension 147

3.9. EVs (ADSCs) and EVs (BM-MSCs) Transfected or Not with Smad2/3siRNA Reduced the Expression Profile of Key Molecules Modulating the Inflammatory Response in the Vascular Wall 161

4. Discussion **167**

5. Conclusions **174**

5.1. Study Limitations **175**

STUDY II. EFFECTS OF AP-1 siRNA-BASED THERAPY ON ARTERIAL AND RIGHT VENTRICULAR DYSFUNCTION ASSOCIATED WITH CARDIAC AND PULMONARY FIBROSIS IN CARDIOPULMONARY DISEASES **177**

1. Introduction and Objectives **177**

2. Materials and Methods **179**

2.1. Murine Model of Cardiopulmonary Disease Induced by MCT Injection, with or without AP-1 siRNA……..... 179

2.2. Biochemical Analysis of Plasma Parameters 181

2.3. Non-Invasive Measurement of Hemodynamic Parameters – Pulmonary Arterial Pressure…..…. 182

2.4. Echocardiographic Evaluation of Pulmonary Artery and Right Ventricle Structure and Function…….. 183

2.5. Myographic Analysis of Functional Responses of Pulmonary Arteries……184

2.6. Measurement of Plasma Levels of TGF-β1, ET-1, TNF-α, IL-1β by ELISA……..... 185

2.7. Analysis of Immune Cell Types in Bronchoalveolar Lavage Fluid…..... 185

2.8. Western Blot Analysis..... 186

2.9. Transmission Electron Microscopy..... 187

2.10. RNA Extraction and RT-qPCR Analysis 188

2.11. Histological Tissue Processing and Examination 189

2.12. Immunofluorescence Analysis 189

3. Results..... **190**

3.1. **Effects of MCT Injection and AP-1 siRNA Treatment on Plasma Biochemical Parameters…..** 190

3.2. Effects of MCT Injection and AP-1 siRNA Treatment on Pulmonary Arterial Hypertension… 192

3.3. **Pulmonary Artery Function in MCT-Induced Pulmonary Hypertension and Effects of AP-1 siRNA Treatment Assessed by Myograph** 196

3.4. Pulmonary Artery and Right Ventricle Structure and Function in MCT-Induced Pulmonary Hypertension and Effects of AP-1 siRNA Treatment Monitored by Echocardiography..... 198

3.5. Ultrastructural Modifications Induced by MCT in Pulmonary Artery, Lung, and Right Ventricle Reduced by AP-1 siRNA Treatment 203

3.6. **Histological Modifications After MCT Administration Were Remediated by AP-1 siRNA Therapy** 208

3.7. **Elevated Plasma Cytokine Levels in Pulmonary Hypertension Induced by MCT Were Attenuated After AP-1 siRNA Treatment**..... 210

3.8. **Modification of Immune and Inflammatory Infiltrate in Bronchoalveolar Lavage Fluid After MCT and AP-1 siRNA Administration** 213

3.9. Reduced Expression of Oxidative Stress, Remodeling Pathways, and Fibrosis Markers in Pulmonary Artery, Lung, and Right Ventricle After AP-1 siRNA Treatment 215

3.10. Molecules Regulating the Inflammatory Response Showed Reduced Expression After AP-1 siRNA Treatment 224

3.11. Gene Expression Analysis of MicroRNAs Involved in the Inflammatory Response Associated with Pulmonary Hypertension Induced by MCT; Effects of AP-1 siRNA Treatment…. 227

4. Discussion **229**

5. Conclusions..... **235**

5.1. Study Limitations **236**

GENERAL CONCLUSIONS **238**

DISSEMINATION AND EXPLOITATION OF RESULTS **242**

BIBLIOGRAPHY **251**

Keywords: vascular endothelium, vascular dysfunction, atherosclerotic cardiovascular disease, extracellular vesicles, siRNA, transcription factor Smad2/3, cardiopulmonary disease, pulmonary arterial hypertension, monocrotaline, right ventricular hypertrophy, fibrosis, transcription factor AP-1.

Total number of pages – 292

Number of figures in Part I – 15

Number of tables in Part I – 2

Number of figures in Part II – 30

Number of tables in Part II – 5

Bibliographic references – 326

Papers published in ISI-indexed journals during the doctoral program – (2 as the first author and 3 as a co-author)

Papers in preparation – 2 as the first author

Abstracts published in ISI-indexed journals – 6 (4 as the first author)

Posters presented at international scientific events – 11 (6 as the first author)

Oral communications presented at international scientific events – 1 (first author)

Patents – 1

Grant received during the doctoral program – 1 (doctoral grant from the Romanian Academy)

Awards for research results by UEFISCDI: 3

Awards for research results by RSCB: 1

Participation in national research projects related to the doctoral thesis topic – 1

Participation in national research projects – 2

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Cardiovascular diseases remain the leading cause of mortality worldwide, with over 17.9 million deaths annually (32% of total deaths), especially in underdeveloped countries[1]. Statistics from Romania show that 3.5 million Romanians suffer from some form of cardiovascular disease, with a mortality rate of 57% of total deaths (approximately 4 out of 10 deaths among men and 6 out of 10 deaths among women[2]). The term refers to all conditions/diseases that affect the heart and blood vessels, with a significant portion being attributed to atherosclerosis.

The vascular endothelium is the inner layer that lines the blood vessel, representing a selective barrier with a number of key functions in ensuring adequate hemostatic stability and vascular tone by maintaining the balance between vasodilation and vasoconstriction. The functional integrity of the endothelium is an essential element for the health of the cardiovascular system, and mechanical/chemical injury or exposure to risk factors leads to endothelial dysfunction, which plays a major role in the onset and progression of cardiovascular diseases, particularly atherosclerosis and hypertension (Pearson, 2000).

Atherosclerosis is a chronic inflammatory fibroproliferative disease, with an autoimmune component, affecting large and medium-sized arteries. It is a progressive, multistage, multifactorial, and polygenic vascular disease involving successive events: in the initial stage, endothelial cells are damaged, leading to endothelial dysfunction, followed by endothelial activation, the formation of lipid streaks, the development of the fibrous cap, and, in advanced stages, plaque rupture and thrombosis. Risk factors underlying the atherogenic process, especially dyslipidemia and hypertension, together with sustained inflammation and increased oxidative stress, lead to endothelial dysfunction, which contributes to plaque formation and the progression of atherosclerosis, ultimately resulting in cardiovascular diseases (Lusis, 2000; Singh et al., 2002; Manduteanu and Simionescu, 2012).

In the pathogenesis of atherosclerosis, perivascular adipose tissue (PVAT), located around the atherosclerotic lesion, plays a very important role. It secretes pro-inflammatory cytokines known as adipocytokines. These cytokines have access to the adjacent vascular wall

[1]https://ec.europa.eu/eurostat/

[2] https://insp.gov.ro/2023/12/04/decembrie-2023-campania-inimi-in-dar/

structure via diffusion through the vasa vasorum and are involved in regulating vascular tone (Tanaka and Sata, 2018).

Vascular calcification (a clinical marker associated with atherosclerosis) is defined as the deposition of minerals in the form of calcium phosphate deposits in the vascular wall. It is a complication of the atherosclerotic process in the advanced stages of the disease (Shi et al., 2020). Calcification represents a systemic disease that leads to plaque instability due to the ability of smooth muscle cells (SMCs) to adopt multiple secretory phenotypes (osteogenic, chondrogenic, osteoclastic, adipogenic) under the influence of an active process resembling bone formation and calcification factors/proteins (Durham et al., 2018; Mackey et al., 2007).

Cardiopulmonary disease encompasses a wide range of serious conditions that affect both the structure and function of the heart (cardiac) and the lungs (pulmonary). These two organs are closely linked, so any problem affecting one organ may compromise the integrity of the other. The most common cardiopulmonary diseases include pulmonary arterial hypertension, atherosclerosis, and coronary artery disease.

In 2021, it was estimated that there were 192,000 prevalent cases of pulmonary arterial hypertension globally. Of these, 119,000 cases were recorded in women (62%) and 73,100 cases in men (38%). The age-adjusted prevalence was 2.28 cases per 100,000 population. The prevalence increased with age, with the highest rates among people aged 75-79 years. In 2021, 22,000 deaths were attributed to pulmonary arterial hypertension worldwide, with an age-adjusted mortality rate of 0.27 deaths per 100,000 population[3].

Pulmonary arterial hypertension is a multifactorial disease characterized by progressive remodeling of the pulmonary artery, which involves complete obliteration of the vessel, leading to increased vascular resistance and ultimately resulting in right ventricular hypertrophy and even heart failure, with an average arterial pressure greater than 25 mmHg at rest[4]. Both pulmonary hypertension and the vascular calcification process associated with atherosclerosis lead to the development of perivascular fibrosis and vascular wall stiffening. Both are associated with structural, functional, and mechanical changes in the vascular wall, characterized by a series of events: increased arterial stiffness, reduced elasticity, impaired

[3] GBD 2021 Pulmonary Arterial Hypertension Collaborators. **Global, regional, and national burden of pulmonary arterial hypertension, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021.** *The Lancet Respiratory Medicine.* 18 October 2024. doi: 10.1016/ S2213-2600(24)00295-9.

[4] https://www.nhlbi.nih.gov/health/pulmonary-hypertension

distensibility, established endothelial dysfunction, and increased vascular tone (Hu et al., 2020).

Fibrosis is a dynamic process, present in both large and small arteries, which in the early stages represents a reversible adaptive response involved in vascular repair. However, the fibrogenic process is progressive, leading to the worsening of vascular wall stiffness with gradual expansion into the interstitial space. In large vessels, fibrosis causes changes in blood flow hemodynamics, with subsequent damage to peripheral tissues (Harvey et al., 2016).

Arterial stiffening is primarily caused by excessive fibrosis and reduced elasticity, in association with increased synthesis of collagen deposits, pronounced degradation and fragmentation of elastin fibers, necrosis in the media layer, calcification, and cross-linking of collagen molecules through final glycation processes (Jia et al., 2015). Vascular fibrosis, together with arterial stiffening, are events that result from the onset of pulmonary/arterial hypertension and a combination of pro-hypertensive factors acting on the extracellular matrix composed of collagen, elastin, fibronectin, and proteoglycans. These pro-hypertensive factors include pro-inflammatory cytokines and interleukins, activation of the renin-angiotensin-aldosterone system, oxidative stress, vasoactive substances (such as Ang II – angiotensin II, ET-1 – endothelin 1), reduced bioavailability of NO (nitric oxide), which in turn stimulate intracellular profibrotic signaling cascades. Following these events, MMP-2 and MMP-9 (Matrix Metalloproteinases 2 and 9) are activated, TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) activity decreases, the expression of PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor) increases, which is associated with the pathogenesis of pulmonary fibrosis. Other molecules involved include CTGF (Connective Tissue Growth Factor) – playing a role in cellular adhesion; Galectin-3 – exhibiting a profibrotic role in various organs such as the liver, kidneys, lungs, and myocardium, also playing a key role in cell proliferation, adhesion, differentiation, angiogenesis, and apoptosis (Mozos et al., 2017; Harvey et al., 2016; Palombo and Kozakova, 2016).

Although they affect different parts of the cardiovascular system, atherosclerosis and pulmonary arterial hypertension are two pathologies that share numerous pathological aspects, such as endothelial dysfunction, chronic inflammation, vascular remodeling, smooth muscle cell (SMC) proliferation, immune dysfunction, and cardiovascular complications, involving similar mechanisms in the disease progression. Conventional treatments, such as

antihypertensive drugs and statins, control only some of the risk factors but do not always prevent the complete progression of the diseases or reduce the changes already produced. Additionally, many patients do not respond sufficiently well to standard treatments, and adverse effects limit treatment options. Genetic and molecular variability among patients underscores the need for developing personalized therapeutic strategies that can address the specificities of each patient.

Extracellular vesicles (EVs) released by endothelial cells under pathological conditions, such as in atherosclerosis, are biomarkers of endothelial dysfunction and can aggravate disease progression by transferring inflammatory signals between cells. The term "extracellular vesicles" (EVs) refers to a distinct class of small particles in the nanometer range (exosomes (40-100 nm)) and microparticles or microvesicles (MVs (100-1500 nm)), which are released by cells physiologically, with this release being amplified under pathological conditions. These vesicles are rich in lipids, proteins, and microRNA (miRNA), which have the ability to post-transcriptionally regulate gene expression in target cells (Ozkocak et al., 2022). Therapies based on small interfering RNA (siRNA), miRNA, and EVs may allow for precise targeting of underlying pathological mechanisms, such as inflammation, endothelial dysfunction, or vascular remodeling, by gene silencing of key molecules. These new therapies are crucial for reducing the mortality and morbidity associated with cardiovascular and cardiopulmonary diseases (Zhang et al., 2017).

Smad2 and Smad3 molecules are essential effectors in the TGF-β1 signaling pathway, which regulates the development and progression of atherosclerosis by influencing processes such as fibrosis, extracellular matrix (ECM) remodeling, and the phenotypic change of vascular smooth muscle cells. Targeted therapy based on siRNA to block Smad2/3 function could protect against these pathogenic effects and, therefore, might be a promising approach for the prevention and treatment of atherosclerosis. Activator protein 1 (AP-1) is a crucial transcription factor that regulates key cellular processes, such as proliferation, differentiation, and apoptosis, responding to extracellular stimuli and stress signals. The use of targeted siRNA to block the AP-1 transcription complex could provide an innovative approach to restore structural and functional changes in pulmonary arterial hypertension (PAH) induced by atherosclerosis and reduce the associated fibrotic and inflammatory processes.

Structure of the Doctoral Thesis

This doctoral thesis is organized into two main parts, divided into six chapters and two original studies.

In the first part of the thesis – ***State of the Art*** – the theoretical aspects are discussed in detail across six chapters. **Chapter 1** and **Chapter 2** describe in detail the anatomy and physiology of the cardiovascular system, the stages of atherogenesis, the molecular mechanisms, and the genetic factors underlying atherosclerotic cardiovascular disease. **Chapter 3** describes the anatomy and physiology of the respiratory system, with a focus on the intrapulmonary airways, while **Chapter 4** details concepts related to pulmonary arterial hypertension (classification, molecular mechanisms, treatment, and the role of miRNAs in the disease pathology). **Chapter 5** presents extracellular vesicles (exosomes and microvesicles) along with their therapeutic applications in numerous pathologies. **Chapter 6** discusses concepts related to gene technologies based on siRNA in cardiovascular diseases.

The second part of the thesis – ***Original Contributions*** – presents the original results obtained in two studies. Both studies focus on endothelial dysfunction as a key phenomenon in the two pathologies studied. Currently, fundamental research is focused on the development of innovative therapies that allow for early diagnosis and personalized treatment of cardiovascular and cardiopulmonary diseases, to intervene before irreversible damage occurs. New approaches, such as the use of biomarkers and nanotechnology, can help identify and address molecular and cellular dysfunctions early. Both studies presented in this doctoral thesis aimed to use therapeutic strategies based on extracellular vesicles and siRNA to regress vascular endothelial dysfunction in the context of two pathologies: atherosclerotic cardiovascular disease and cardiopulmonary disease (pulmonary arterial hypertension). The two diseases were investigated in vivo through two murine experimental models that aimed to reproduce as faithfully as possible the manifestations encountered in patients: the simultaneous hyperlipidemic-hypertensive hamster model and the MCT-induced pulmonary arterial hypertension hamster model.

STUDY (I) Vascular Wall Damage in Atherosclerotic Cardiovascular Disease; The Beneficial Effect of Extracellular Vesicle-Based Therapy on Endothelial Dysfunction and Involved Molecular Markers

The purpose of this study was to investigate the effects of nanotherapy based on extracellular vesicles (EVs) derived from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) or bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs), either transfected or not with Smad2/3siRNA, on endothelial dysfunction and key molecules involved in atherosclerosis. To this end, an animal model of atherosclerosis, the hyperlipidemic-hypertensive Golden Syrian hamster, was transplanted with EVs (ADSCs) or EVs (BM-MSCs), transfected or not with Smad2/3siRNA, or with Smad2/3siRNA alone. Thus, the effects of EVs (ADSCs) or EVs (BM-MSCs) transfected or not with Smad2/3siRNA on the consequences of an atherogenic diet on vascular health were compared. In general, EVs or siRNA technology are widely used in the development of experimental therapies for many pathologies.

The general objective of this study was to characterize the structural and functional aspects of the 'in vivo' experimental model of atherosclerotic cardiovascular disease and to validate EVs (ADSCs) or EVs (BM-MSCs) as potential therapeutic strategies in restoring vascular function.

The following **specific objectives** were set:

(1) Generation of the animal model of atherosclerotic cardiovascular disease transplanted or not with EVs (ADSCs) or EVs (BM-MSCs) from healthy hamsters, transfected or not with Smad2/3siRNA;

(2) Investigation of endothelial dysfunction, vascular calcification, and specific inflammatory markers in the experimental model of atherosclerotic cardiovascular disease;

(3) Exploration of mechanisms involved in vascular dysfunction by investigating the Ang II; TGF-β1/Smad2,3 signaling pathway, which activates transcription factors such as ATF2, NF-kB, AP-1, leading to the subsequent alteration in the expression of miRNA-21, miRNA-192, miRNA-200b, miRNA-29a, miRNA-210, and miRNA-146a;

(4) Evaluation of the potential beneficial effect of EVs 'in vivo'.

Results Obtained in Study I

The results of Study I demonstrate that: Compared to the HH group, treatment with EVs (ADSCs) or EVs (BM-MSCs), alone or combined with Smad2/3siRNA, or treatment with Smad2/3siRNA alone, significantly reduces plasma lipid levels and improves the structure and function of affected blood vessels (aortic artery and carotid artery) by decreasing the expression of molecular and cellular targets involved in the progression of atherosclerotic disease, such as:

- Decreased expression of structural and inflammatory markers, including COL1A1, α-SMA, Cx43, VCAM-1, MMP-2.
- A slight infiltration of total macrophages/M1 and T-cells.
- Reduced ROS production in the cytosol.
- Significant reduction in plasma concentrations of TGF-β1 and Ang II proteins.
- Significant structural and functional improvements: thinning of the arterial wall, increased inner diameter, improved distensibility, reduced Vel and VTI, and increased contractile and relaxation responses to NA and ACh.
- A reduced protein expression profile of Smad2/3, ATF-2, NF-kBp50/p65.
- Significant reduction in the expression levels of miRNA-21, miRNA-29a, miRNA-192, miRNA-200b, miRNA-210, and miRNA-146a.

Conclusions of Study I:

- EV-based therapies derived from stem cells, particularly EVs (ADSCs), led to regression of structural and functional changes in the vascular wall and the expression of key orchestrators involved in endothelial dysfunction induced by atherosclerosis.
- Smad2/3 siRNA transfection of EVs enhanced the ability of EVs (ADSCs) or EVs (BM-MSCs) to regress the atherosclerotic process mediated by inflammation.

The results of this study were published in the journal *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10:817180, DOI: 10.3389/fcell.2022.817180, with an impact factor of 6.68, Q1 (Comarița et al., 2022).

STUDY (II) Effects of siRNA AP-1 Mediated Therapy on Pulmonary Arterial and Right Ventricular Dysfunction Associated with Cardiac and Pulmonary Fibrosis in Cardiopulmonary Diseases

The purpose of this study was to explore vascular dysfunction and associated perivascular fibrosis in an experimental animal model of pulmonary arterial hypertension; investigating the potential beneficial effect of AP-1 siRNA.

For generating the experimental animal model with pulmonary hypertension, monocrotaline (MCT), a toxic pyrrolizidine alkaloid, is used, which induces pulmonary arterial hypertension within 1-2 weeks after administration. For the desired effect, MCT must undergo conversion into its active form (MCTP) in the liver via oxidative processes mediated by cytochrome P450 (Nogueira-Ferreira et al., 2015; Stenmark et al., 2009). After MCTP becomes metabolically active, it exerts pneumotoxic effects that cause endothelial cell damage in the pulmonary artery, contributing to endothelial dysfunction. Other pathophysiological and histopathological features of MCT administration include vascular remodeling, right ventricular hypertrophy, acute vascular inflammation (infiltration of monocytes/macrophages, T lymphocytes, dendritic cells), hyperplasia and thickening of the vascular wall, particularly in the intima and media, the installation of fibrosis, muscularization of initially non-muscularized arteries and arterioles through increased α-SMA expression, formation of plexiform lesions (a hallmark of advanced stages) leading to lumen obstruction, thickening of the adventitia, and vessel stiffening (Bueno-Beti et al., 2018). Recent studies have shown that in animal models of pulmonary hypertension, reduced expression of miRNAs regulating anti-apoptotic molecules like Bcl-2 and Bcl-X, von Willebrand factor (vWF), and VEGFR2 receptor, is associated with the presence of proliferative perivascular lesions in the outer tunica (Ruiter et al., 2013).

The general objective of this study was to obtain and characterize the experimental 'in vivo' model with cardiopulmonary disease and to follow the effect of AP-1 siRNA as a potential therapeutic strategy in the recovery of vascular dysfunction and associated perivascular fibrosis.

The following **specific objectives** were set:

(1) Generation of the animal model with cardiopulmonary disease (pulmonary hypertension and associated perivascular fibrosis);
(2) Evaluation of endothelial dysfunction, perivascular fibrosis, and specific inflammatory markers in the experimental cardiopulmonary disease model;
(3) Evaluation of pulmonary fibrosis and specific inflammatory markers in the experimental cardiopulmonary disease model;
(4) Exploration of mechanisms involved in vascular dysfunction and perivascular fibrosis by investigating the PKC - FAK/ILK – TAK- JNK/ERK signaling pathway;
(5) Investigation of the potential beneficial effect of siRNA AP-1 'in vivo'.

Results Obtained in Study II

The results of Study II demonstrate that: Compared to the MCT group, treatment with siRNA AP-1 had significant beneficial effects on the investigated tissues (pulmonary artery, right ventricle, and lungs) contributing to:

- Reduction of plasma concentrations of TGF-β1/ET-1/IL-1β/TNF-α.
- Reduced cytosolic ROS production in the pulmonary artery, right ventricle, and lungs, along with significant improvements in the ultrastructure of these tissues.
- Decreased expression of inflammatory and fibrotic markers in the pulmonary artery (COL1A, Fibronectin, Vimentin, α-SMA, CTGF, Calponin, MMP-9), right ventricle, and lungs (COL1A, CTGF, Fibronectin, α-SMA, F-actin, OB-cadherin), and an increase in endothelial markers (CD31, VE-cadherin) in the pulmonary artery.
- Structural and functional improvements in the pulmonary artery (reduced Vel, restored vascular reactivity (NA contraction and ACh relaxation)) and right ventricle (increased internal cavity diameter in diastole, increased TAPSE, and PRVOF), associated with a reduction in systolic and diastolic blood pressure and heart rate.
- Reduced expression profile of AP-1S3/pFAK/FAK/pERK/ERK proteins.
- Significant reduction in the expression levels of miRNA-145, miRNA-210, miRNA-21, and miRNA-214, along with an increase in miRNA-124 and miRNA-204 in the pulmonary artery.

- Significant increase in the expression levels of miRNA-145 and miRNA-204, along with a decrease in miRNA-210, miRNA-21, and miRNA-214 in the right ventricle.

Conclusions of Study II:

- siRNA AP-1-based therapy improved pulmonary arterial and right ventricular function, associated with the regression of perivascular and interstitial fibrosis in the pulmonary artery, right ventricle, and lungs, and a reduction in key inflammatory and fibrotic markers in hamsters with cardiopulmonary disease (pulmonary arterial hypertension).

The results of this study were published in the *Journal of Translational Medicine*, 2024, DOI: 10.1186/s12967-024-04933-1, with an impact factor of 8.44, Q1 (Comarița et al., 2022).

DISSEMINATION AND EXPLOITATION OF RESULTS

The results obtained during the doctoral program (2020-2025) within the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" of the Romanian Academy were employed as follows:

- Publications in ISI-indexed journals (5): 2 as first author and 3 as co-author
- Abstracts published in ISI-indexed journals (6): 4 as main author and 2 as co-author
- Participation in international conferences (12) in the form of 1 oral presentation and 11 posters
- Awards granted by UEFISCDI (3) and 1 award granted by the Romanian Society for Cell Biology (RSCB)
- Data included in a patent application at OSIM
- Doctoral scholarship: Romanian Academy (SCOSAAR)
- H-index: 5
- Citations: 108 (Google Scholar profile) [5]

SCIENTIFIC PAPERS PUBLISHED IN ISI-INDEXED JOURNALS WITH IMPACT FACTOR

First author (2):

1. **Comarița I.K.,** Vîlcu A., Constantin A., Procopciuc A., Safciuc F., Alexandru N., Dragan E., Nemecz M., Filippi A., Chițoiu L., Gherghiceanu M., Georgescu A. **Therapeutic Potential of Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles on Atherosclerosis-Induced Vascular Dysfunction and Its Key Molecular Players**. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022, *10*, doi:10.3389/fcell.2022.817180 – impact factor- 6.684, Q1
2. **Comarița I. K.,** Tanko G., Anghelache I.L., Georgescu A. **The siRNA-mediated knockdown of AP-1 restores the function of the pulmonary artery and the right ventricle by reducing perivascular and interstitial fibrosis and key molecular players in cardiopulmonary disease.** J Transl Med.; 22(1):137, 2024. doi: 10.1186/s12967-024-04933-1- impact factor - 8.440, Q1

[5] https://scholar.google.com/citations?user=Rb6fJsIAAAAJ&hl=ro&oi=ao

Co-author (3):

1. Nicoleta Alexandru, Anastasia Procopciuc, Alexandra Vîlcu, **Ioana Karla Comarița**, Elisabeta Bădilă, Adriana Georgescu. **Extracellular vesicles—incorporated microRNA signature as biomarker and diagnosis of prediabetes state and its complications.** *Rev Endocr Metab Disord* (2021), doi.org/10.1007/s11154-021-09664-y – impact factor 9.30, Q1
2. Constantin A, **Comarița IK**, Alexandru N, Filippi A, Bojin F, Gherghiceanu M, Vîlcu A, Nemecz M, Niculescu LS, Păunescu V, Georgescu A. **Stem cell-derived extracellular vesicles reduce the expression of molecules involved in cardiac hypertrophy-In a model of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes.** *Front Pharmacol*, 2022, doi: 10.3389/fphar.2022.1003684 - impact factor - 5.98, Q1
3. Nemecz, M., Stefan, D.S., **Comarița, I.K.** *et al.* **Microvesicle-associated and circulating microRNAs in diabetic dyslipidemia: miR-218, miR-132, miR-143, and miR-21, miR-122, miR-155 have biomarker potential**. *Cardiovasc Diabetol* **22**, 260 (2023). doi.org/10.1186/s12933-023-01988-0 - impact factor 9.3, Q1

ABSTRACTS PUBLISHED IN ISI-INDEXED JOURNALS

1. N. Alexandru, A. Constantin, M. Nemecz, **I. K. Comarița**, A. Vîlcu, A. Procopciuc, G. Tanko, A. Georgescu. **Effects of endothelial progenitor cell therapy on microRNA expression profiles in plasma, platelets and platelet-derived microvesicles in atherosclerosis**. Poster 401 /#1275 at the '88th European Atherosclerosis Society Virtual Congress' (EAS 2020), October 4th-7th, 2020, Geneva, Switzerland, Abstract in Atherosclerosis, Volume 315, Page e136, Publication date: 2020/12/1, DOI: https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.10.420
2. **I.K. Comarița**, A. Vîlcu, A. Procopciuc, F. Safciuc, A. Constantin, M. Nemecz, G. Tanko, N. Alexandru**,** A. Georgescu. **The hypertensive-hyperlipidemic hamster, an experimental animal model of atherosclerosis to investigate the vascular dysfunction and cardiac hypertrophy**. Poster 347 / #1345 at the '88th European Atherosclerosis Society Virtual Congress' (EAS 2020), October 4th-7th, 2020, Geneva, Switzerland.

Abstract in Atherosclerosis, Volume 315, Page e120, Publication date: 2020/12/1, DOI: https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.10.367

3. **Comarița, K.I** et al. **Vascular wall damage in atherosclerotic cardiovascular disease; Positive effect of extracellular vesicle-based nanotherapeutics on endothelial dysfunction and its key molecular players.** Poster 042/#1044 at the '90th European Atherosclerosis Society Hybrid Congress' (EAS 2022), May 22th -25th, 2022, Milano, Italy, Abstract in *Atherosclerosis*, Volume 355, pg. 29, Publication date: August 2022, DOI: https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2022.06.315
4. **Ioana Karla Comarița**, Alina Constantin, Alexandra Vîlcu, Anastasia Procopciuc, Florentina Safciuc, Nicoleta Alexandru, Emanuel Dragan, Miruna Nemecz, Alexandru Filippi, Adriana Georgescu. **Inflammation-induced arterial dysfunction in atherosclerosis; the modulating action of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles.** 'Frontiers in CardioVascular Biomedicine,' 29th April – 1st May 2022, Budapest – Hungary. Abstract No. 70108 in Cardiovascular Research 118 (Supplement_1), cvac066. 187, 2022.
5. Miruna Nemecz, Diana Simona Stefan, Alina Constantin, Anastasia Procopciuc, **Ioana Karla Comarița**, Gabriela Tanko, Adriana Georgescu. **MicroRNAs in circulating microvesicles and plasma as biomarkers that complement the clinical diagnosis of diabetic dyslipidemia and its complications.** 'Frontiers in CardioVascular Biomedicine', 29 April - 1 May 2022, Budapest – Hungary. Abstract No. 70246 in Cardiovascular Research 118 (Supplement_1), cvac066. 224, 2022.
6. **I K Comarița**, I L Anghelache, G Tanko, A Georgescu, **The effects of siRNA-mediated knockdown of AP-1 on pulmonary arterial and right ventricular dysfunction associated with cardiac and pulmonary fibrosis in cardiopulmonary disease**, Cardiovascular Research, Volume 120, Issue Supplement_1, May 2024, cvae088.205.

POSTERS PRESENTED AT INTERNATIONAL MEETINGS

1. **Ioana Karla Comarița**, Alina Constantin, Alexandra Vîlcu, Anastasia Procopciuc, Florentina Safciuc, Nicoleta Alexandru, Emanuel Dragan, Miruna Nemecz, Alexandru Filippi, Adriana Georgescu. **Inflammation-induced arterial dysfunction in atherosclerosis; the modulating action of mesenchymal stem cell-derived**

extracellular vesicles. *'Frontiers in CardioVascular Biomedicine,'* 29th April – 1st May 2022, Budapest – Hungary.

2. Miruna Nemecz, Diana Simona Stefan, Alina Constantin, Anastasia Procopciuc, **Ioana Karla Comarița**, Gabriela Tanko, Adriana Georgescu. **MicroRNAs in circulating microvesicles and plasma as biomarkers that complement the clinical diagnosis of diabetic dyslipidemia and its complications**. *'Frontiers in CardioVascular Biomedicine'*, 29th April – 1st May 2022, Budapest – Hungary.
3. **Comarița, K.I** et al. **Vascular wall damage in atherosclerotic cardiovascular disease; Positive effect of extracellular vesicle-based nanotherapeutics on endothelial dysfunction and its key molecular players**. Poster 042/#1044 at the '90th European Atherosclerosis Society Hybrid Congress' (EAS 2022), May 22th -25th, 2022, Milano, Italy.
4. Miruna Nemecz, Diana Simona Stefan, Gabriela Tanko, Alina Constantin, **Ioana Karla Comarița**, Adriana Georgescu. **Microvesicle-related and circulating microRNAs as potential biomarkers of diabetic dyslipidemia,** The anniversary symposium of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" "43 years of sustaining an excellence-promoting environment for cardiovascular research in Romania", December 8th-9th, Bucharest, Romania.
5. **Ioana Karla Comarița**, Alexandra Vîlcu, Alina Constantin, Florentina Safciuc, Nicoleta Alexandru, Miruna Nemecz, Alexandru Filippi, Adriana Georgescu**. Therapeutic potential of stem cell-derived extracellular vesicles on atherosclerosis-induced vascular dysfunction and its key molecular players,** The anniversary symposium of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" "43 years of sustaining an excellence-promoting environment for cardiovascular research in Romania", December 8th-9th, 2022, Bucharest, Romania.
6. Alina Constantin, **Ioana Karla Comarița**, Nicoleta Alexandru, Alexandru Filippi, Alexandra Vîlcu, Miruna Nemecz, Adriana Georgescu. **Stem cell - derived extracellular vesicles reduce the expression of molecules involved in cardiac hypertrophy - in a model of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes,** The anniversary symposium of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae

Simionescu" "43 years of sustaining an excellence-promoting environment for cardiovascular research in Romania", December 8th-9th , 2022, Bucharest, Romania.

7. **Ioana Karla Comarița**, Gabriela Tanko, Laurențiu Anghelache, Alina Constantin, Miruna Nemecz, Nicoleta Alexandru-Moise, Adriana Georgescu. **Tracking The Effect Of siRNA AP-1 As A Potential Therapeutic Strategy In Reversing The Pulmonary Arterial And Right Ventricular Dysfunction Associated With Cardiac And Pulmonary Fibrosis In A Model Of Cardiopulmonary Disease.** The 44th Annual Scientific Symposium Of The Institute Of Cellular Biology And Pathology "Nicolae Simionescu" - ICBP-NS - Held Jointly With 40th Annual Scientific Session Of The Romanian Society For Cell Biology - RSCB , 16-17 November 2023, Bucharest, Romania.
8. **Ioana Karla Comarița**, Alina Constantin, Alexandra Vîlcu, Anastasia Procopciuc, Florentina Safciuc, Nicoleta Alexandru, Miruna Nemecz, Adriana Georgescu. **Arterial dysfunction in an animal model of atherosclerosis; the beneficial effect of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in reducing inflammation**. 1st Meeting of the AtheroNET COST Action CA21153, 22th-24th March 2023, Bucharest, Romania.
9. **I K Comarița**, I L Anghelache, G Tanko, A Georgescu, The effects of siRNA-mediated knockdown of AP-1 on pulmonary arterial and right ventricular dysfunction associated with cardiac and pulmonary fibrosis in cardiopulmonary disease, *'Frontiers in CardioVascular Biomedicine,* 12-14 april, 2024, Amsterdam, The Netherlands.
10. Alexandra Vilcu, **Ioana Karla Comarița,** Alina Constantin, Nicoleta Alexandru-Moise, Miruna Nemecz, Gabriela Tanko, Adriana Georgescu. **Cardiac hypertrophy in atherosclerotic cardiovascular disease: molecular mechanisms and therapeutic approaches.** 41st Annual Scientific Session Of The Romanian Society For Cell Biology International Conference Under The Auspices Of The Romanian Academy And The Academy Of Medical Sciences. December 11-13, 2024, Târgu Mureș.
11. Constantin A, **Comarița IK**, Nemecz M, Vilcu A , Georgescu A, Alexandru-Moise N. **Immune Modulation Of T Cells By Platelets And Microvesicles In Experimentally Induced Atherosclerosis.** 41st Annual Scientific Session Of The Romanian Society For

Cell Biology International Conference Under The Auspices Of The Romanian Academy And The Academy Of Medical Sciences. December 11-13, 2024, Târgu Mureș.

ORAL PRESENTATIONS AT INTERNATIONAL CONFERENCES

1. 38th Annual Scientific Session of The Romanian Society for Cell Biology, Oral presentation: **Therapeutic Potential Of Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles On Atherosclerotic-Induced Vascular Dysfunction**, 4-6 November 2021, Bucharest, Romania.

SCHOLARSHIP OBTAINED DURING THE DOCTORAL PROGRAM

- Doctoral Scholarship: Romanian Academy (SCOSAAR): 2020-2023

PATENTS

- Process for obtaining modified extracellular vesicles. Patent Application, OSIM No. A / 00017 of 20.01.2021.
- Authors: Alexandru Filippi, Nicoleta Alexandru-Moise, Alina Constantin, **Karla Comarița**, Alexandra Vîlcu, Anastasia Procopciuc, Adriana Georgescu

AWARDS

UEFISCDI AWARDS FOR RESEARCH RESULTS

1. 'Scientific Achievements – Original Article' Award offered by the Ministry of Education and Research and Uefiscdi: Subprogram 1.1 - Human Resources - Research results award - Articles, Competition 2021. Evaluation results List 2- First applications submitted for articles published in the year 2021_18.11.2021, November 2021 for the article: "Extracellular vesicles—incorporated microRNA signature as biomarker and diagnosis of prediabetes state and its complications. Rev Endocr Metab Disord, 1-24, 2021 Jun 18. doi: 10.1007/s11154-021-09664-y". (Nicoleta Alexandru, Anastasia Procopciuc, Alexandra Vîlcu, **Ioana Karla Comariţa**, Elisabeta Bedilə, Adriana Georgescu).

2. ‘Scientific Achievements – Original Article’ Award offered by the Ministry of Education and Research and Uefiscdi: Prize for research results - Web of Science Articles - 2023, within PN IV, Program 5.2 - Human Resources, Subprogram 5.2.3 - Support, List 1 - First applications submitted for published articles in 2021 and 2022 - 13.03.2023 for the article: "Therapeutic Potential of Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles on Atherosclerosis-Induced Vascular Dysfunction and Its Key Molecular Players" in "Frontiers in Cell Developmental Biology" (**Comarița I.K**, Vîlcu A., Constantin A., Procopciuc A., Safciuc F., Alexandru N., Dragan E., Nemecz M., Filippi A., Chiţoiu L., Gherghiceanu M., Georgescu A).

3. ‘Scientific Achievements – Original Article’ Award offered by the Ministry of Education and Research and Uefiscdi: Prize for research results - Web of Science Articles - 2023, within PN IV, Program 5.2 - Human Resources, Subprogram 5.2.3 - Support, List 1 - First applications submitted for published articles in 2021 and 2022 - 13.03.2023 for the article: "Stem cell-derived extracellular vesicles reduce the expression of molecules involved in cardiac hypertrophy-In a model of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes" in Frontiers in Pharmacology (Constantin A , **Comarița IK**, Alexandru N, Filippi A, Bojin F, Gherghiceanu M, Vîlcu A, Nemecz M, Niculescu LS, Păunescu V, Georgescu A.).

RSCB AWARDS FOR RESEARCH RESULTS

- First Prize - For the best Poster: **Tracking the effect of siRNA AP-1 as a potential therapeutic strategy in reversing the pulmonary arterial and right ventricular dysfunction associated with cardiac and pulmonary fibrosis in a model of cardiopulmonary disease** at The 44th Annual Scientific Symposium Of The Institute Of Cellular Biology And Pathology "Nicolae Simionescu" - ICBP-NS - Held Jointly With 40th Annual Scientific Session Of The Romanian Society For Cell Biology - RSCB, 16-17 November 2023, Bucharest, Romania.

ATTENDANCE TO COURSES AND SEMINARS

- DIABETER online workshop “A new therapeutic tool in autoimmune diabetes: Mesenchymal Stromal Cell”, November 20, 2020, IBPC “Nicolae Simionescu”, Bucharest, Romania.
- THERAVALDIS online workshop: "Diabetes in cardiovascular diseases; pathogenic mechanisms and targeted therapies", November 27, IBPC "Nicolae Simionescu", Bucharest, Romania.
- INTERA online workshop: “Recent advances in the field of obtaining nanovectors for gene transfection”, April 22, 2021, IBPC “Nicolae Simionescu”, Bucharest, Romania.
- INTERA-1 Summer School “Encapsulation of cells and drugs: materials, procedures and applications”, 13-14 May 2021, IBPC “Nicolae Simionescu”, Bucharest, Romania.
- Prof. Dimitris Kardassis: Lectures to the students (Lipoprotein pathways and their roles in the pathophysiology of atherosclerosis / Transcriptional Regulation of Cardiovascular Genes: Basic principles and methodologies in vitro and in vivo / Hormone Nuclear receptors: from basic biology to clinical exploitation in CVD), 14-18 November, 2024, IBPC “Nicolae Simionescu”, Bucharest, Romania.

PARTICIPATION IN NATIONAL RESEARCH PROJECTS RELATED TO THE DOCTORAL THESIS TOPIC

- **2018-2020: Grant of the Romanian National Authority for Scientific Research and Innovation**, **CNCS-UEFISCDI, - Complex Projects Completed in CDI Consortia (PCCDI)** / under Program 1. Developing national CD, Subprogram 1.2. Institutional performance - "Institutional Development Project". Project no: PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0527/ Contract no: 83PCCDI/2018,

  Project Title: Development of BIOnanotechnologies based on Extracellular Vesicles, applicable in the early diagnosis, prognosis and therapy of atherosclerotic disease.

Acronym BIOVEA.

Complex project director: Dr. CSI Adriana Georgescu.

COLLABORATOR ON THE FOLLOWING NATIONAL PROJECTS

- **2020-2022: Grant of the Romanian National Authority for Scientific Research and Innovation, CNCS –UEFISCDI, Program Human Resources/ Project number PN-III-P1-1.1-TE-2019-0811:** / Grant no: 97 /04.09.2020.

  Project title: Immune modulation of T-cells by platelets and platelet-derived microvesicles in experimental induced atherosclerosis; the role of microRNA-142-3p

  Acronym: IMPLEXIA

  Project leader: Dr. CSII Alexandru-Moise Nicoleta.

- **2023-2026: Grant of the Ministry of Research, Innovation and Digitization of Romania - Romania's National Recovery and Resilience Plan.** Component C9. SUPPORT FOR THE PRIVATE SECTOR, RESEARCH, DEVELOPMENT AND INNOVATION - "I8. Development of a program to attract highly specialised human resources from abroad in research, development and innovation activities" (PNRR /2022/C9/MCID/I8)- Project Code 93.

  Project title: New nanotherapeutic strategies for cardiac fibrosis targeting the mechanisms underlying the fibroblast to myofibroblast transition;

  Project Acronym: HeartCure

  Project Manager: Dr. ROSTYSLAV BILYY

  Principal Researchers: Adriana Georgescu, Manuela Călin, Elena Butoi

Bibliography

1. Bueno-Beti, C., Sassi, Y., Hajjar, R. J. & Hadri, L. 2018. Pulmonary Artery Hypertension Model in Rats by Monocrotaline Administration. *Methods Mol Biol,* 1816**,** 233-241.
2. Durham, A. L., Speer, M. Y., Scatena, M., Giachelli, C. M. & Shanahan, C. M. 2018. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res,* 114**,** 590-600.
3. Harvey, A., Montezano, A. C., Lopes, R. A., Rios, F. & Touyz, R. M. 2016. Vascular Fibrosis in Aging and Hypertension: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Can J Cardiol,* 32**,** 659-68.
4. Hu, Y., Chi, L. & Kuebler, W. M. 2020. Perivascular Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. 9.
5. Jia, G., Aroor, A. R., Demarco, V. G., Martinez-Lemus, L. A., Meininger, G. A. & Sowers, J. R. 2015. Vascular stiffness in insulin resistance and obesity. *Front Physiol,* 6**,** 231.
6. Lusis, A. J. 2000. Atherosclerosis. *Nature,* 407**,** 233-41.
7. Mackey, R. H., Venkitachalam, L. & Sutton-Tyrrell, K. 2007. Calcifications, arterial stiffness and atherosclerosis. *Adv Cardiol,* 44**,** 234-244.
8. Manduteanu, I. & Simionescu, M. 2012. Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders? *J Cell Mol Med,* 16**,** 1978-90.
9. Mozos, I., Malainer, C., Horbanczuk, J., Gug, C., Stoian, D., Luca, C. T. & Atanasov, A. G. 2017. Inflammatory Markers for Arterial Stiffness in Cardiovascular Diseases. *Front Immunol,* 8**,** 1058.
10. Nogueira-Ferreira, R., Vitorino, R., Ferreira, R. & Henriques-Coelho, T. 2015. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulm Pharmacol Ther,* 35**,** 8-16.
11. Ozkocak, D. C., Phan, T. K. & Poon, I. K. H. 2022. Translating extracellular vesicle packaging into therapeutic applications. *Front Immunol,* 13**,** 946422.
12. Palombo, C. & Kozakova, M. 2016. Arterial stiffness, atherosclerosis and cardiovascular risk: Pathophysiologic mechanisms and emerging clinical indications. *Vascul Pharmacol,* 77**,** 1-7.

13. Pearson, J. D. 2000. Normal endothelial cell function. *Lupus,* 9**,** 183-8.

14. Ruiter, G., De Man, F. S., Schalij, I., Sairras, S., Grunberg, K., Westerhof, N., Van Der Laarse, W. J. & Vonk-Noordegraaf, A. 2013. Reversibility of the monocrotaline pulmonary hypertension rat model. *Eur Respir J,* 42**,** 553-6.

15. Shi, X., Gao, J., Lv, Q., Cai, H., Wang, F., Ye, R. & Liu, X. 2020. Calcification in Atherosclerotic Plaque Vulnerability: Friend or Foe? *Front Physiol,* 11**,** 56.

16. Singh, R. B., Mengi, S. A., Xu, Y. J., Arneja, A. S. & Dhalla, N. S. 2002. Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Exp Clin Cardiol,* 7**,** 40-53.

17. Stenmark, K. R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W. J. & Mcmurtry, I. F. 2009. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,* 297**,** L1013-32.

18. Tanaka, K. & Sata, M. 2018. Roles of Perivascular Adipose Tissue in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Front Physiol,* 9**,** 3.

19. Zhang, J., Zu, Y., Dhanasekara, C. S., Li, J., Wu, D., Fan, Z. & Wang, S. 2017. Detection and treatment of atherosclerosis using nanoparticles. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol,* 9.

ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOLOGIE ŞI PATOLOGIE CELULARĂ
„ NICOLAE SIMIONESCU”

TEZĂ DE DOCTORAT

Lipoproteine sintetice cu potenţial terapeutic în ateroscleroză

REZUMAT

Conducător ştiinţific: Acad. MAYA SIMIONESCU

Doctorand: Florina-Irina Tudorache

BUCURESTI
2023

REZUMAT

Cuvinte cheie: Ateroscleroza, Apolipoproteine, Nanotehnologie, Reglare genica, Nanoparticule, ApoE, ApoA-I.

Număr total de pagini – 128

Număr de figuri în Partea I – 14

Număr de tabele în Partea I – 2

Număr de figuri în Partea II – 37

Număr de tabele în Partea II – 6

Referințe bibliografice – 327

Lucrări publicate în reviste indexate ISI în perioada stagiului de doctorat – 4 (2 autor principal)

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale – 6 (autor principal)

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – 2

Cursuri și specializări - 1

Bursă obținută pe durata programului doctoral – 1 (bursă doctorală de la Academia Română)

Participarea la proiecte de cercetare naționale legate de tematica tezei de doctorat – 5

INTRODUCERE ŞI OBIECTIVE

Ateroscleroza este una dintre principalele cauze de mortalitate în ţările dezvoltate. Datele din literatură susţin că ateroscleroza este o boală multifactorială in care inflamația și dislipidemia se intersectează și că indiferent de inițiator, ambele participă din stadiile incipiente până la soarta finală a plăcii ateromatoase. Unul dintre factorii de risc majori în ateroscleroză este modificarea homeostaziei plasmatice, cum ar fi hipercolesterolemia. Aceasta afectează inițial celulele endoteliale, pe care le activează şi ca urmare, acestea incep să exprime noi molecule de adeziune și factori chemotactici ce conduc la initierea unui proces inflamator. Inflamația implică recrutarea de celule imune circulante care agravează și accelerează dezvoltarea ateromului [1]. Răspunsul inflamator inițial poate fi considerat ca un mecanism de apărare, dar amplificarea sa ulterioară accelerează ateroscleroza [2, 3]. De asemenea, componentele lipoproteinelor plasmatice, diverse structuri microbiene sau proteinele de șoc termic induc un proces inflamator care, de la sine, poate genera formarea plăcii aterosclerotice. Aproximativ jumatate dintre pacienți dezvoltă ateroscleroză în absența hipercolesterolemiei sistemice [4].

Deși întregul sistem vascular este expus factorilor de risc, ateroscleroza se dezvoltă preferențial in anumite zone precum punctele de ramificație, peretele exterior al bifurcațiilor, peretele interior al curburilor sau valvele cardiace, zone caracterizate prin variații ale stresului de curgere sau tulburări ale fluxului [5, 6]. Dezvoltarea ateromului este un proces continuu. Implicarea progresivă a celulelor rezidente și nerezidente vasculare și a produselor lor de secreție defineste o secvență de etape consecutive care duc de la formarea de striuri lipidice, la placa fibro-lipidică și în cele din urmă, la ruptura plăcii și aterotromboză [2].

Lipoproteinele sunt structuri alcătuite în principal din lipide şi proteine. Ele îndeplinesc funcţia de transport a colesterolului, trigliceridelor şi fosfolipidelor în plasmă. Lipoproteinele prezintă două componente: un înveliş extern hidrofil care conţine apolipoproteine, fosfolipide şi colesterol neesterificat şi nucleul central hidrofob, alcătuit din colesterol esterificat şi trigliceride. Apolipoproteinele asigură solubilitatea lipoproteinelor, dar sunt şi cofactori enzimatici sau liganzi pentru receptori celulari specifici. Se cunosc patru clase majore de apolipoproteine: A, B, C şi E. Apolipoproteina E (apoE) este o componentă a lipoproteinelor plasmatice, care participă la îndepărtarea lipoproteinelor aterogene din circulaţie. Studiile *in vitro* şi *in vivo* au arătat că mutaţii ale apoE sunt asociate cu nivel crescut de colesterol şi ateroscleroză prematură, atât în animale experimentale, cât şi la oameni [7]. Nivelul fiziologic de apoE în plasmă este asociat cu scăderea riscului bolilor cardiovasculare, prin reducerea nivelului de lipoproteine aterogene circulante, prin efluxul de colesterol, dar şi prin inhibarea expresiei moleculelor de adeziune la suprafaţa endotelială [8].

Progresele recente în terapiile cardiovasculare au dus la dezvoltarea de noi agenți care vizează apolipoproteine specifice pentru a reduce riscul de ateroscleroză [9, 10].

Știința nanoparticulelor schimbă rapid perspectiva diferitelor domenii științifice și definește noi platforme tehnologice. Acest lucru este și mai evident în domeniul nanomedicinei în care au fost utilizate nanoparticulele ca instrument pentru tratamentul și diagnosticul multor boli [11]. Cu toate acestea, în ciuda imensului beneficiu conferit, există și restricţionari ale acestei tehnologii care vizează efectele pe termen scurt și lung asupra organismului uman.

Scopul acestei teze de doctorat a fost determinarea unor mecanisme de reglare genică ce duc la diminuarea expresiei unor apolipoproteine și producerea de nanoparticule pe bază de fulerenol cuplate cu apoE (Full-apoE) care mimeaza particulele de lipoprotein, care ar putea fi utilizate pentru a compensa expresia scazuta a apoE.

Ipoteza noastră afirmă că nanoparticulele pe bază de fulerenol, având legate pe suprafaţă molecule de apoE (Full-apoE), imită lipoproteinele bogate în apoE, oferind beneficii anti-aterosclerotice semnificative, fără efecte secundare.

STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

În prima parte a tezei sunt prezentate datele din literatură care vizează funcțiile specializate ale lipoproteinelor şi apolipoproteinelor asociate, împreună cu rolurile acestora în circulaţia lipidelor în plasmă și în dezvoltarea aterosclerozei (**Capitolul 1**), precum şi exemple de noi terapii promițătoare care vizează apolipoproteine specifice și care ar putea reduce în cele din urmă riscul de ateroscleroză.

În **Capitolul 2** sunt sintetizate nanotehnologiile personalizate pentru ţintirea celulelor implicate în dezvoltarea placilor aterosclerotice şi principalele clase de nanoparticule utilizate în diagnosticul sau tratamentul aterosclerozei. De asemenea, au fost evidentiate metodele de sinteză, stabilitatea și principalele caracteristici antioxidante ale moleculei de fulerenol.

În partea a doua a tezei sunt prezentate rezultatele originale obţinute asupra reglarii genice a unor apolipoproteine importante în procesul de aterogeneză şi sinteza unor nanoparticule cu potenţial anti-aterosclerotic. În **capitolul 3** sunt prezentate rezultatele obţinute *in vivo* şi *in vitro* asupra reglarii unor apolipoproteine implicate în dezvoltarea placilor aterosclerotice de către unele polihidrocarburi aromatice prezente în mediu: Bisfenol A (BPA) şi Benzo(a)piren (BaP). Atât BPA cât şi BaP activează factori de transcriere care se leagă la situsurile specifice de la nivelul promotorilor apolipoproteinelor apoA-I şi/sau apoC-I şi contribuie la dezvoltarea leziunilor aterosclerotice, prin mecanisme care implică activarea NF-κB sau AHR.

Metodele folosite şi prezentate în **capitolul 4** au avut ca scop obţinerea prin biotehnologie a proteinei apoE-ε3 marcată şi secretată de celule mamaliene, pentru a construi nanosisteme cu izoforma apoE-ε3.

În **capitol 5** sunt prezentate metodele pentru obţinerea de nanoparticule pe bază de fulerenol, complexate cu apoE şi testarea efectului anti-aterosclerotic *in vivo* pe linia de şoareci apoE deficienţi. Nanoparticulele obţinute pe bază de fulerenol şi apoE combină proprietățile anti-hiperlipidemice și anti-oxidative ale fulerenolului cu proprietățile anti-aterosclerotice și anti-inflamatorii ale apoE și pot reprezenta o strategie promițătoare pentru combaterea aterosclerozei.

CONCLUZII GENERALE

Deși rezultatele clinice în bolile coronariene s-au îmbunătățit considerabil în ultimele câteva decenii, incidența infarctului miocardic și a accidentului vascular cerebral continuă să rămână ridicată. Nanotehnologia oferă o abordare unică prin dezvoltarea nanoparticulelor multifuncționale, specifice celulei. Aceasta va conduce spre noi frontiere în diagnosticare și terapie prin țintirea moleculelor implicate în procesele care conduc la ateroscleroză, păstrând astfel potențialul de îmbunătățire continuă a rezultatelor cardiovasculare.

În această lucrare, am analizat reglarea a unor apolipoproteine importante în procesul de aterogeneză de către substanţele prezente în mediu: bisfenol A (BPA) şi benzo[a]piren (BaP). Pornind de la ipoteza că efectele pro-aterogenice ale BPA sunt mediate, cel puțin parțial, de reglarea negativă a genei APOA-I, conducând astfel la o cantitate scăzută de HDL anti-aterosclerotic, am investigat dacă BPA modulează expresia genei APOA-I și mecanismele moleculare implicate în această reglare. Rezultatele obţinute pe șoarecii $LDLR^{-/-}$ tratați cu BPA au arătat că (i) BPA a crescut aria leziunilor aterosclerotice în aortele șoarecilor $LDLR^{-/-}$; (ii) a scăzut nivelurile HDL și apoA-I și a crescut concentrațiile plasmatice de colesterol și trigliceride; (iii) mecanismul acestui proces implică activarea căilor NF-kB și în consecință, reducerea expresiei apoA-I în ficat. Datele noastre au demonstrat că promotorul APOA-I conține situsuri funcționale de legare a NF-kB care sunt responsabile pentru reglarea expresiei genice APOA-I indusă de BPA.

De asemenea, am investigat potențialul modulator al BaP asupra expresiei unor apolipoproteine cheie în metabolismul lipidic: apoA-I, apoC-I şi apoE, și am urmarit un posibil mecanism prin care BaP modulează expresia acestor apolipoproteine, prin studii *in vitro,* în hepatocite. Rezultatele acestui studiu arată că BaP induce reglarea apoA-I şi apoC-I în hepatocite printr-un mecanism dependent de Aryl hidrocarbon receptor (AHR). AHR se leagă la situsurile active din promotorii apoA-I şi apoC-I şi conduce la scăderea expresiei apoA-I, respectiv creşterea expresiei apoC-I, în hepatocite, ceea ce determină un potenţial risc pentru dezvoltarea şi mentinerea placilor aterosclerotice. Un posibil mecanism de reglare a acestor apolipoproteine pe baza rezultatelor obţinute şi a ceea ce se cunoaşte din literatura ar putea fi atât direct prin AHR, cât şi indirect prin dimerizarea altor factori de transcriere.

În finalul lucrării am abordat strategii nanotehnologice care ţintesc regresia placilor aterosclerotice. Pentru aceasta am aprofundat tehnicile de inginerie genetică pentru obţinerea de

plasmide care să exprime apoE recombinantă. Cu aceste plasmide, am transfectat stabil celule mamaliene care au sintetizat si secretat apoE în mediul de cultură, de unde am putut izola proteina de interes, prin cromatografie de afinitate. Am utilizat această proteină în scopul obţinerii unor nanoparticule cu potenţial terapeutic în ateroscleroză.

Nanoparticulele cu apoE, au fost utilizate pentru tratarea şoarecilor apoE deficienţi şi am observat câteva beneficii anti-aterosclerotice semnificative. Rezultatele obţinute în urma administrării nanoparticulelor Full-apoE (NP Full-apoE) derivatizate la șoarecii apoE$^{-/-}$ aterosclerotici au arătat că NP Full-apoE: (i) au fost incluse în fracțiile HDL și VLDL; (ii) au fost distribuite în principal în ficat, dar și în alte țesuturi (cum ar fi creier, plămân și rinichi); (iii) au determinat o expresie hepatică crescută a moleculelor importante implicate în metabolismul lipidic (cum ar fi apoA-I, ABCA1, SR-B1 și sortilina); (iv) au determinat o scădere a nivelului de colesterol plasmatic și (v) au inhibat evoluția plăcilor aterosclerotice. Nanoparticulele pe bază de fulerenol care poartă complexat cu apoE-ε3 combină proprietățile anti-hiperlipidemice și anti-oxidative ale fulerenolului cu proprietățile anti-aterosclerotice și antiinflamatorii ale apoE-ε3 și pot reprezenta o strategie promițătoare pentru ateroscleroză.

Principalele **contribuţii originale ale acestei lucrări sunt:**

(i) mecanismul de reglare genică pentru APOA-I ca raspuns la activitatea BPA, prin activarea NF-kB şi identificarea situsurilor responsabile de legare a factorilor de transcriere de pe promotorul genei APOA1, avand în consecinţă scaderea expresiei genice APOA-I.

(ii) reglarea genică a APOA-I şi APOC-I ca răspuns la BaP prin activarea AHR şi translocarea în nucleu, unde se leagă la promotorii acestor gene inducând o scadere a APOA-I şi o creştere a APOC-I, ceea ce indică un mecanism pro-aterosclerotic.

(iii) obţinerea de vectori plasmidiali care să codifice apoE recombinantă şi transfecţia stabilă a celulelor endoteliale (bEnd.3) şi macrofage (RAW 293.7) care să exprime proteina apoE glicozilată în mediul de creştere al celulelor.

(iv) Conceperea și caracterizarea nanoparticulelor pe bază de fulerene cuplate cu apoE şi validarea *in vivo* a efectelor anti-aterosclerotice ale Full-apoE.

VALORIFICAREA REZULTATELOR

Rezultatele obținute în perioada desfasurarii programului doctoral din cadrul Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu" al Academiei Române au fost:

● publicate în 4 lucrări în reviste indexate ISI: 1 ca prim-autor, 1 în calitate de co-autor şi 2 recenzii;

● prezentate în cadrul conferințelor naţionale şi internaționale sub forma a 2 prezentări orale și 6 postere.

ACTIVITĂŢI DESFĂŞURATE ÎN CADRUL STAGIULUI DE DOCTORAT

Lucrări publicate în reviste internaţionale cotate ISI:

1. *Apolipoprotein E - A Multifunctional Protein with Implications in Various Pathologies as a Result of Its Structural Features*. (Review) ***Tudorache IF**, *Trusca VG, Gafencu AV.Comput Struct Biotechnol J. 2017 Jun 6;15:359-365. doi: 10.1016/j.csbj.2017.05.003. eCollection 2017. PMID: 28660014
2. *The Mechanism of Bisphenol A Atherogenicity Involves Apolipoprotein A-I Downregulation through NF-κB Activation*. Trusca VG, Dumitrescu M, Fenyo IM, **Tudorache IF**, Simionescu M, Gafencu AV.Int J Mol Sci. 2019 Dec 12;20(24):6281. doi: 10.3390/ijms20246281. PMID: 31842455
3. *Synthetic lipoproteins based on apolipoprotein E coupled to fullerenol have anti-atherosclerotic properties.* **Tudorache IF**, Bivol VG, Dumitrescu M, Fenyo IM, Simionescu M, Gafencu AV. Pharmacol Rep. 2022 Aug;74(4):684-695. doi: 10.1007/s43440-022-00379-8. Epub 2022 Jul 5. PMID: 35790693.
4. *Apolipoprotein A-II, a Player in Multiple Processes and Diseases.* (Review) *Florea G, ***Tudorache IF**, Fuior EV, Ionita R, Dumitrescu M, Fenyo IM, Bivol VG, Gafencu AV. Biomedicines. 2022 Jul 2;10(7):1578. doi: 10.3390/biomedicines10071578. Free PMC article. PMID: 35884883

Comunicări orale la manifestări ştiinţifice naţionale şi internaţionale:

1. Biotechnological approaches for labeling of apolipoprotein E secreted by mammalian cells, SRBC 2016

2. Apolipoprotein E gene regulation by ligand-activated AHR, Advanced Course on Crossroads of Atherosclerosis, Immunology & Lipids (AIL); EAS 2016

Postere la manifestări ştiinţifice naţionale şi internaţionale:

1. Apolipoprotein E gene regulation by omeprazole activated AHR/ARNT complex, *Irina Grosu, Violeta Trusca, Anca Gafencu***,** SRBC 2015**.**
2. Biotechnological approaches to prepare synthetic lipoproteins with therapeutic potential in atherosclerosis; *Irina F. Tudorache, Violeta G. Trusca, Elena V. Fuior, Anca V. Gafencu***,** *EAS* 2017.
3. Regulation of apolipoproteins by ligand-activated aryl hydrocarbon receptor; *Irina F. Tudorache, Violeta G. Trusca, Anca V. Gafencu,* BIT 2017
4. Benzo(a)pyrene -activated AHR regulates apolipoproteins expression in hepatocytes; *Irina F. Tudorache, Violeta G. Trusca, Anca V. Gafencu*, EAS 2018
5. Fullerenol – based nanoparticles carrying apolipoprotein E; *Irina. F. Tudorache, M. Dumitrescu, V.G. Trusca, M.I. Fenyo, M. Simionescu, A.V. Gafencu,* MMT 2021
6. Anti-atherosclerotic properties of fullerenol- based nanoparticles carring apoE3; *Irina. F. Tudorache, M. Dumitrescu, V.G. Trusca, M.I. Fenyo, M. Simionescu, A.V. Gafencu,* SRBC 2021

Specializări şi cursuri efectuate:

1. EAS Advanced Course on Crossroads of Atherosclerosis, Immunology & Lipids (AIL) Amsterdam, The Netherlands, 22 March - 25 March, 2016.

Participarea la proiecte de cercetare:

1. Combined hormonal treatment-induced gene transactivation of anti-atherosclerotic proteins as an innovative therapeutic approach for atherosclerosis.
2. Genetically engineered apolipoproteins immobilized on nanoparticles: a Molecular Trojan horse targeting atherosclerotic plaque.
3. Intelligent therapies for non-communicable diseases based on controlled release of pharmacological compounds from encapsulated engineered cells and targeted bionanoparticles.
4. Demonstration of the enhanced anti-atherosclerotic potential of apolipoprotein E targeted

to the activated endothelium by fusion with VCAM-1 binding peptide.

5. Apolipoprotein A-II derived peptides with anti-atherosclerotic potential.

BURSA OBȚINUTĂ PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL

Bursă de doctorat: Academia Română (SCOSAAR): 2015-2018

FINANŢAREA CERCETĂRILOR:

PN-II-RU-TE-2014-4-2660. Transactivarea genelor pentru proteine anti-anterosclerotice prin tratamente hormonale combinate, cu abordare terapeutică în ateroscleroză, director de proiect Dr. Violeta Trușcă;

PN-II-RU-TE-2014-4-2143. Apolipoproteine generate prin inginerie genetică imobilizate pe nanoparticule: un cal troian molecular pentru ţintirea plăcii aterosclerotice, Director de proiect Dr. Anca Gafencu;

Academia Română -SCOSAAR

Bibliografie selectivă:

1. Libby, P., et al., *Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice.* J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(23): p. 2129-38.
2. Manduteanu, I. and M. Simionescu, *Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders?* J Cell Mol Med, 2012. **16**(9): p. 1978-90.
3. Horejsi, B. and R. Ceska, *Apolipoproteins and atherosclerosis. Apolipoprotein E and apolipoprotein(a) as candidate genes of premature development of atherosclerosis.* Physiol Res, 2000. **49 Suppl 1**: p. S63-9.
4. Millonig, G., G.T. Malcom, and G. Wick, *Early inflammatory-immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY)-study.* Atherosclerosis, 2002. **160**(2): p. 441-8.
5. VanderLaan, P.A., C.A. Reardon, and G.S. Getz, *Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(1): p. 12-22.
6. Simionescu, N., et al., *Prelesional events in atherogenesis. Accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit.* Am J Pathol, 1986. **123**(1): p. 109-25.
7. Zannis, V.I., et al. *8 Lipoproteins and atherogenesis*. 2004.
8. Gaudreault, N., et al., *Macrophage-specific apoE gene repair reduces diet-induced hyperlipidemia and atherosclerosis in hypomorphic Apoe mice.* PLoS One, 2012. **7**(5): p. e35816.
9. Ritchie, H. and M. Roser. *Causes of Death*. 2018.
10. Linton, M.F., et al., *The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
11. Foroozandeh, P. and A.A. Aziz, *Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles.* Nanoscale Res Lett, 2018. **13**(1): p. 339.

ROMANIAN ACADEMY
School of Advanced Studies of the Romanian Academy
Institute of Cell Biology and Patology „Nicolae Simionescu”

PhD THESIS SUMMARY

Innovative nanotherapeutic strategies for targeting vascular inflammation in atherosclerosis.

PhD COORDINATOR:
Acad. ILEANA MÂNDUȚEANU

PhD STUDENT:
MARIA FLORENTINA ANGHELACHE

2025

TABLE OF CONTENTS

LIST OF ABBREVIATIONS **6**

I. INTRODUCTION **8**

II. CURRENT STATE OF THE ART **13**

II.1. Cardiovascular System: Organization and Functionality *14*

II.1.1. Components of the cardiovascular system 14

II.1.1.1. The heart 14

II.1.1.2. Blood vessels 14

II.2. Inflammation in Atherosclerosis *17*

II.2.1. Acute inflammation 18

II.2.2. Chronic inflammation 18

II.2.3. Mechanisms of inflammation 19

II.2.4. Stages of atherosclerotic plaque formation 21

II.2.4.1. Endothelial cell activation 21

II.2.4.2. Endothelial dysfunction and LDL accumulation 23

II.2.4.3. Amplification of the inflammatory process 24

II.2.4.4. Formation and stabilization of the atherosclerotic plaque 26

II.2.4.5. Development of the necrotic core and plaque rupture 27

II.3. Inflammation Resolution in Atherosclerosis *29*

II.3.1. Specialized pro-resolving mediators (SPMs) 32

II.3.1.1. SPM biosynthesis and resolution indices 33

II.3.1.2. Main classes of SPMs and their physiological role 34

II.3.1.3. Interaction of SPMs with GPCR receptors 40

II.3.2. The role of macrophages in resolving inflammation in atherosclerotic plaques 45

II.4. Current Approaches in Atherosclerosis Treatment *48*

II.4.1. Non-pharmacological approach 48

II.4.2. Lipid-lowering therapies 48

II.4.3. Anti-thrombotic therapies 50

II.4.4. Anti-inflammatory therapies 50

II.5. Nanotechnology in Atherosclerosis Therapy *53*

II.5.1. Tipuri de nanoparticule 53

II.5.1.1. Nanoparticule anorganice 53

II.5.1.2. Organic nanoparticles 53

II.5.2. Strategies for targeting the vascular wall 58
II.5.2.1. Passive targeting..... 59
II.5.2.2. Active targeting..... 59
II.6. Nanotherapy for Atherosclerosis via Promotion of Inflammation Resolution 67
II.6.1. Pharmacological agents for inflammation resolution..... 67
II.6.1.1. Synthetic molecules and SPM analogues..... 67
II.6.1.2. Agents that indirectly modulate pro-resolving pathways 68
II.6.2. Nanoplatforms for delivering specialized pro-resolving mediators or their analogues 69
II.6.3. Clinical studies 72
III. ORIGINAL CONTRIBUTIONS.....73
A. CHARACTERIZATION AND TESTING OF MAGNETIC NANOPARTICLE SYSTEMS COATED WITH DEXTRAN AND LOADED WITH PROTOCATECHUIC ACID IN VASCULAR INFLAMMATION THERAPY.....74
III.A.1. Characterization and in vitro evaluation of dextran-coated magnetic nanoparticles loaded with protocatechuic acid.....74
III.A.1.1. Introduction and objectives 74
III.A.1.2. Experimental protocols and analysis methods 76
III.A.1.2.1. Reagents 76
III.A.1.2.2. Synthesis of magnetic nanoparticles (MNPs) 76
III.A.1.2.3. Synthesis of dextran-coated MNPs (MNP-Dex) 77
III.A.1.2.4. Synthesis of dextran-coated MNPs loaded with PCA (MNP-Dex/PCA)..... 77
III.A.1.2.5. PCA loading onto MNP-Dex..... 77
III.A.1.2.6. Morphological analysis of MNP-Dex/PCA 78
III.A.1.2.7. Size and Zeta potential..... 78
III.A.1.2.8. *In vitro* cellular model..... 78
III.A.1.2.9. Cell cytotoxicity tests..... 79
III.A.1.2.10. Internalization of magnetic nanoparticles..... 80
III.A.1.2.11. Monocyte adhesion test 80
III.A.1.3. Results..... 83
III.A.1.3.1. Physicochemical characterization of magnetic nanoparticles loaded with PCA..... 83
III.A.1.3.2. *In vitro* evaluation of cytotoxicity of PCA-loaded magnetic nanoparticles..... 86
III.A.1.3.3. Intracellular localization of MNP-Dex/PCA..... 88

III.A.1.3.4. Anti-inflammatory effect of MNP-Dex/PCA 89
III.A.1.4. Discussion and partial conclusions 96
B. DEVELOPMENT OF A BIOMIMETIC DRUG DELIVERY SYSTEM FOR PROMOTING INFLAMMATION RESOLUTION IN ATHEROSCLEROSIS 100
III.B.1. Synthesis and characterization of nanocarriers loaded with pro-resolving mediators for atherosclerosis treatment.....100
III.B.1.1. Introduction and objectives 100
III.B.1.2. Experimental protocols and analysis methods 102
III.B.1.2.1. Reagents..... 102
III.B.1.2.2. Cell culture 102
III.B.1.2.3. Isolation of macrophage membranes..... 103
III.B.1.2.4. Preparation of lipid nanoemulsions (LN) loaded with SPMs (LN/SPM) 103
III.B.1.2.5. Preparation of biomimetic lipid nanoemulsions loaded with SPMs (Bio-LN/SPM) 104
III.B.1.2.6. Determination of size and Zeta potential 104
III.B.1.2.7. Transmission electron microscopy with negative staining (TEM) 105
III.B.1.2.8. Determination of SPM incorporation into nanoemulsions 105
III.B.1.2.9. Detection of macrophage membrane proteins in Bio-LN/SPM by immunoblotting 106
III.B.1.3. Results 108
III.B.1.3.1. Synthesis strategy for biomimetic nanoparticles (Bio-LN/SPM)..... 108
III.B.1.3.2. Bio-LN/SPM contain macrophage-derived membrane proteins..... 110
III.B.1.3.3. Bio-LN/SPM are an effective platform for maintaining SPM stability..... 111
III.B.1.3.4. Bio-LN/SPM show long-term high stability 113
III.B.1.4. Discussion and partial conclusions..... 114
III.B.2. Use of nanocarriers for in vitro delivery of pro-resolving mediators to vascular and immune cells involved in plaque development.....116
III.B.2.1. Introduction and objectives 116
III.B.2.2. Experimental protocols and analysis methods 117
III.B.2.2.1. Synthesis of biomimetic nanoparticles (Bio-LN/SPM)..... 117
III.B.2.2.2. *In vitro* cellular model 117
III.B.2.3. Results 123
III.B.2.3.1. Cell viability and internalization of Bio-LN/SPM by endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages 123

III.B.2.3.2. Binding of Bio-LN/SPM to the surface of endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages; role of SPM receptors 126
III.B.2.3.3. Bio-LN/SPM inhibit monocyte adhesion and transmigration through activated endothelial cells 130
III.B.2.3.4. Exposure to Bio-LN/SPM increases macrophage phagocytic activity 132
III.B.2.3.5. Exposure to Bio-LN/SPM reduces expression of inflammation-associated proteins in endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages 133
III.B.2.4. Discussion and partial conclusions 135
III.B.3. Use of nanocarriers for targeted delivery of pro-resolving mediators to atherosclerotic plaques in the ApoE -/- murine model for inflammation resolution 138
III.B.3.1. Introduction and objectives 138
III.B.3.2. Protocoale experimentale și metode de analiză 140
III.B.3.2.1. Modelul animal de ateroscleroză 140
III.B.3.2.2. Hemocompatibility test 140
III.B.3.2.3. Evaluation of liver and kidney function 141
III.B.3.2.4. Mouse cytokine array 141
III.B.3.2.5. Immune cell evaluation 142
III.B.3.2.6. *Ex vivo* imaging of biomimetic nanoparticle biodistribution 142
III.B.3.2.7. Oil Red O (ORO) staining 143
III.B.3.2.8. Statistical analysis 143
III.B.3.3. Results 144
III.B.3.3.1. Bio-LN/SPM can be administered in vivo without inducing acute side effects 144
III.B.3.3.2. Bio-LN/SPM accumulate in atherosclerotic lesions of ApoE$^{-/-}$ mice 148
III.B.3.4. Discussion and partial conclusions 151
III.B.4. Evaluation of the therapeutic effect of biomimetic nanocarriers loaded with pro-resolving mediators on atherosclerotic plaque development 154
III.B.4.1. Introduction and objectives 154
III.B.4.2. Experimental protocols and analysis methods 157
III.B.4.2.1. Synthesis and characterization of biomimetic lipid nanoemulsions loaded with SPMs (Bio-LN/SPMs) 157
III.B.4.2.2. Animal model of atherosclerosis and treatment strategy 158
III.B.4.2.3. Tissue collection and processing 159
III.B.4.2.4. Plasma investigations 159
III.B.4.2.5. Flow cytometry investigations 160

III.B.4.2.6. Aortic investigations 161
III.B.4.2.7. Statistical analysis 166
III.B.4.3. Results 167
III.B.4.3.1. Preparation and characterization of Bio-LN/SPM 167
III.B.4.3.2. In vivo administration of Bio-LN/SPMs improves lipid metabolism and renal function and shows no detectable liver toxicity 168
III.B.4.3.3. Bio-LN/SPMs reduce plasma proteins associated with complement activation and inflammation 170
III.B.4.3.4. Bio-LN/SPMs induce an anti-inflammatory profile in circulating monocytes 171
III.B.4.3.5. Bio-LN/SPMs promote inflammation resolution by reducing MCP-1 expression and monocyte infiltration into murine arteries 174
III.B.4.3.6. Bio-LN/SPMs exert anti-inflammatory effects in the aorta of ApoE$^{-/-}$ mice 176
III.B.4.3.7. Bio-LN/SPM promote inflammation resolution in plaques by polarizing macrophages toward a reparative M2 phenotype 177
III.B.4.3.8. Treatment with Bio-LN/SPM attenuates inflammation and stimulates resolution in aortic root lesions 179
III.B.4.3.9. Treatment with Bio-LN/SPM reduces lipid deposits in atherosclerotic plaques in ApoE$^{-/-}$ mice 181
III.B.4.4. Discussion and partial conclusions 183
IV. GENERAL CONCLUSIONS 189
V. REFERENCES 192

SUMMARY

Keywords: atherosclerosis, vascular inflammation, resolution of inflammation, specialized pro-resolving mediators, nanotherapy, biomimetic nanoparticles, endothelial cells, vascular smooth muscle cells, macrophages.

Total number of pages: 237

Number of figures in Part I: 12

Number of tables in Part I: 1

Number of figures in Part II: 41

Number of tables in Part II: 8

Bibliographic references: 400

Published papers in ISI-indexed journals during PhD: 12 (5 as first author)

Abstracts in ISI-indexed journals: 4 (1 as first author)

Posters presented at international scientific events: 5 (first author)

Oral presentations at international scientific events: 3 (first author)

Patents: 1

Scholarships during PhD program: 2

Specializations and courses: 3

Awards: 3

Participation in research projects: 5

A. Introduction and Objectives

Cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of mortality in Romania, responsible for over 55% of annual deaths (National Institute of Public Health, 2024). In this context, atherosclerosis (AS), a chronic inflammatory condition of the vascular wall, plays a central role in the development of acute cardiovascular complications such as myocardial infarction or stroke. Although conventional therapies such as statins and antithrombotic agents reduce the incidence of cardiovascular events, they fail to effectively address persistent vascular inflammation, an essential component of atherosclerotic plaque progression (d'Aiello et al., 2024).

In particular, it has been shown that the failure of inflammation resolution, an active and coordinated physiological process, contributes significantly to plaque instability and disease progression (Fredman, 2019). In this context, specialized pro-resolving mediators (SPMs), such as resolvins or lipoxins, represent an emerging class of molecules capable of restoring vascular homeostasis by actively inducing inflammation resolution. However, the therapeutic use of SPMs is limited by their low stability in circulation and poor bioavailability at the site of the atherosclerotic lesion (Fredman & Serhan, 2024).

In parallel, natural compounds such as protocatechuic acid (PCA), with anti-inflammatory and antioxidant roles, have been proposed as adjuvants in combating endothelial and macrophage inflammation. Nevertheless, their therapeutic efficacy is limited by low bioavailability and nonspecific targeting (Cory et al., 2018). Nanotechnology offers an innovative solution to these challenges, facilitating targeted delivery and protection of compounds of interest in stable pharmaceutical forms (Ahmad et al., 2022).

Based on these premises, **the main objective of this doctoral thesis** was the development and characterization of **innovative nanotherapeutic platforms** for combating vascular inflammation in AS, with the following complementary mechanisms: (1) active induction of inflammation resolution by delivering SPMs or (2) inhibition of pro-atherogenic inflammatory pathways by delivering PCA.

The following specific **objectives** were proposed and achieved:

1. Characterization and testing of dextran-coated magnetic nanoparticles loaded with protocatechuic acid (MNP-Dex/PCA), aimed at inhibiting vascular inflammation by

reducing the expression of pro-inflammatory cytokines and monocyte adhesion to activated endothelial cells (ECs), in *in vitro* cellular models.

2. Development and characterization of biomimetic nanoparticles loaded with SPMs (Bio-LN/SPM) and testing their in vitro effects on the inflammatory phenotype of ECs, macrophages (Mφ), and smooth muscle cells (SMCs) involved in AS pathogenesis.

3. Evaluation of the biodistribution and acute effects of Bio-LN/SPM nanoparticles in a murine model of AS (hyperlipidemic ApoE$^{-/-}$ mice), by analyzing accumulation in the aorta, changes in the composition of circulating immune cells, and the inflammatory cytokine profile at 24 hours after administration.

4. Validation of the preclinical efficacy of the pro-resolving nanotherapeutic strategy in AS, in the ApoE$^{-/-}$ murine model, by demonstrating the therapeutic effect of Bio-LN/SPM nanoparticles on atherosclerotic lesions at two plaque progression stages, with emphasis on reducing vascular inflammation and lipid accumulation in the aorta and aortic root.

B. Structure of the thesis

The doctoral thesis is structured into two major parts:

Part I – Current state of the art includes an analysis of the literature regarding the role of inflammation in atherosclerosis (AS), the molecular mechanisms involved in its resolution, and emerging nanotherapeutic strategies that can positively influence disease progression. This part comprises six chapters that provide a solid theoretical basis for developing the two experimental directions.

Chapter 1 presents the structural and functional organization of the cardiovascular system, with emphasis on the architecture of the arterial wall and the critical role of ECs in maintaining vascular homeostasis. Imbalances that can disrupt endothelial function and contribute to the onset of vascular pathologies, such as AS, are discussed.

Chapter 2, "Inflammation in Atherosclerosis," systematically details the stages of atherosclerotic lesion progression, from endothelial activation and LDL accumulation in the

subendothelial space to foam cell formation, necrotic core development, and plaque rupture. It highlights the inflammatory processes that increase plaque vulnerability and the involved cellular elements.

Chapter 3 is dedicated to the concept of "Resolution of inflammation" as an active process with complex regulatory mechanisms, distinct from classical inflammation inhibition. A complete conceptual framework of specialized pro-resolving mediators (SPMs) such as lipoxins, resolvins, maresins, and protectins is presented, emphasizing their role in restoring tissue homeostasis. An extensive synthesis of the classes, functions, mechanisms of action, and receptors of these mediators is detailed in this chapter, forming the theoretical foundation for the pro-resolving pharmacological strategies proposed later in the experimental part of the thesis.

Chapter 4 highlights the limitations of current conventional therapies, which mainly target lipid lowering or suppression of the inflammatory response. These strategies fail to prevent the progression of atherosclerotic lesions and do not address the cause of persistent inflammation. Thus, the need for innovative therapeutic interventions capable not only of inhibiting inflammation but also activating physiological resolution mechanisms is justified, promoting restoration of vascular homeostasis.

Chapter 5 introduces the field of nanomedicine, focusing on nanotherapy applied to CVDs. The types of nanoparticles used in this context are detailed, emphasizing targeted delivery advantages and functionalization strategies designed to increase therapeutic efficacy. The concept of biomimetic nanoparticles is also presented, highlighting their potential to mimic natural cellular components to facilitate specific recognition of inflamed tissues and improve targeted distribution of therapeutic agents.

Chapter 6 explores direct applications of SPMs and their synthetic analogues in chronic inflammation and AS. It describes preclinical studies and potential research directions in which SPMs are considered promising therapies with mechanisms complementary to traditional anti-inflammatory drugs.

Part II – Original contributions is dedicated to the experimental studies performed, divided into two distinct nanotherapeutic directions:

Chapter 1 describes the development, characterization, and *in vitro* evaluation of dextran-coated magnetic nanoparticles loaded with protocatechuic acid (MNP-Dex/PCA). The study demonstrates the effectiveness of these nanoparticles in reducing pro-inflammatory cytokine expression in ECs and M1-type macrophages. Additionally, MNP-Dex/PCA inhibit NF-κB and MAPK signaling pathways and reduce monocyte adhesion to activated endothelium, supporting their potential in vascular inflammation therapy.

Chapter 2 is dedicated to a comprehensive study comprising experimental sections that promote active resolution of inflammation using biomimetic nanoparticles loaded with specialized pro-resolving mediators (Bio-LN/SPM).

- Section 1 presents the biomimetic nanoparticle synthesis process and physicochemical characterization, including composition, size, and zeta potential evaluation.
- Section 2 analyzes the *in vitro* effects of these nanoparticles on AS-relevant cell lines (ECs, Mφ, and SMCs). A significant reduction in inflammatory marker expression and promotion of an anti-inflammatory phenotype were observed.
- Section 3 focuses on the *in vivo* testing of Bio-LN/SPM in the $ApoE^{-/-}$ murine model, 24 hours post-injection. Nanoparticle distribution and acute effects on the immune profile were evaluated.
- Section 4 investigates the therapeutic impact of Bio-LN/SPM on atherosclerotic lesions in $ApoE^{-/-}$ mice at two different progression stages (4 weeks and 8 weeks of high-fat diet), highlighting reductions in systemic and local inflammation and lipid accumulation, as well as induction of a pro-resolving phenotype in plaque-associated Mφ.

Thus, the structure of the thesis reflects an integrated and progressive approach, from a detailed understanding of AS pathology and molecular processes involved in inflammation and resolution, to the experimental development and validation of innovative therapeutic solutions. Each chapter logically and scientifically contributes to strengthening the research hypothesis and demonstrating the applicability of nanomedicine in personalized treatment of vascular inflammation associated with AS.

C. Main results and conclusions:

1. Development of MNP-Dex/PCA magnetic nanoparticles as theranostic vehicles combining diagnosis and therapy in a single platform

- Stable colloidal nanoparticles were obtained, in which PCA was efficiently adsorbed onto the nanoparticle surface and maintained in active form.
- MNP-Dex/PCA were efficiently taken up by endothelial cells and pro-inflammatory M1 macrophages, without cytotoxic effects at concentrations < 100 μg/mL.
- Treatment with MNP-Dex/PCA led to:
    - Inhibition of inflammatory signaling pathways NF-κB and MAPK with reduced expression of IL-1β, TNF-α, IL-6, MCP-1, p38, and ERK1/2.
    - Decreased monocyte adhesion to activated endothelium.

These data confirm the potential of these nanoparticles to inhibit the vascular inflammatory response, opening the possibility of their use in preventing the progression of atherosclerotic plaque.

2. Development and preclinical validation of biomimetic nanoparticles loaded with specialized pro-resolving mediators in a murine model of atherosclerosis

- Nanoemulsions coated with cellular membranes were obtained to mimic the structure of circulating monocytes, with SPMs as active cargo (Bio-LN/SPM).
- *In vitro*, Bio-LN/SPM:
    - Reduced inflammatory marker expression (VCAM-1, MCP-1, NLRP3, IL-1β),
    - Promoted a pro-resolving M2 phenotype in macrophages (decreased iNOS and increased phagocytic capacity),
    - Decreased monocyte adhesion and transmigration through activated endothelium.
- *In vivo* (ApoE$^{-/-}$ mice fed a high-fat diet):
    - Intravenous administration of Bio-LN/SPM led, after 24 hours, to:
        - Reduction of circulating monocytes and neutrophils,
        - Decreased plasma levels of cytokines (IFN-γ, CXCL10, IL-16, TIMP-1, and TNF-α) and chemokines (MCP-1 and C5a),
        - Selective accumulation in the aorta

- Repeated administration at two different stages of plaque progression demonstrated:
  - Reduced systemic inflammation and modulation of circulating immune populations,
  - Decreased local inflammation and induction of a pro-resolving M2 phenotype in aortic macrophages, shown by increased expression of CD206 and MerTK markers, along with decreased iNOS levels,
  - Reduced lipid accumulation in lesions

These results confirm that Bio-LN/SPM not only inhibit inflammation but also promote its resolution, reprogramming the immune phenotype and the aortic microenvironment.

D. Original contributions of the thesis

1. Development of two nanotherapeutic platforms with complementary mechanisms, validated in vitro or in vivo, for combating vascular inflammation:

a) MNP-Dex/PCA – anti-inflammatory effect via inhibition of NF-κB and MAPK (Figure 1).

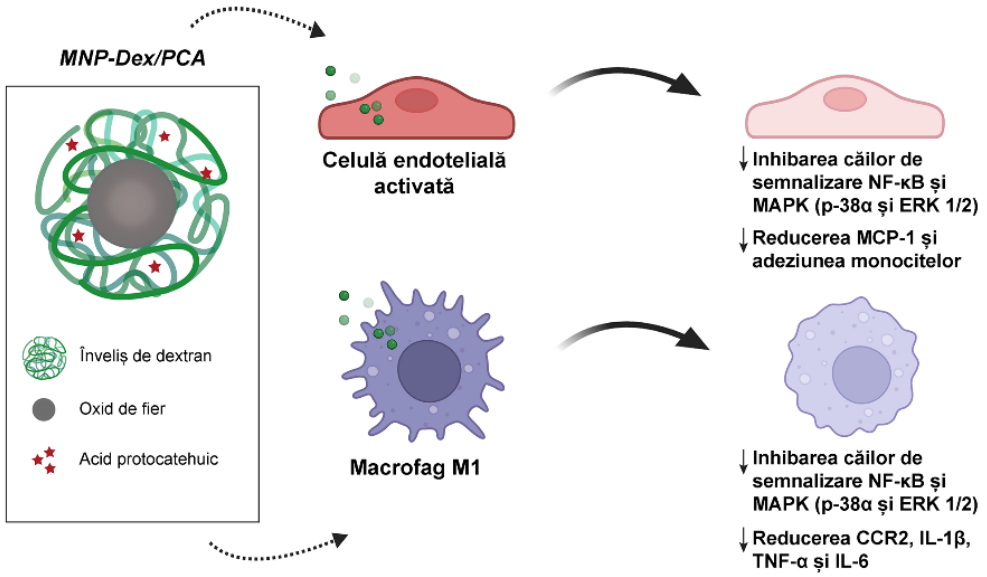


Figure 1. Nanotherapeutic strategy developed in the first study for combating vascular inflammation associated with AS. The scheme illustrates the mechanism of action of dextran-coated magnetic nanoparticles loaded with protocatechuic acid (MNP-Dex/PCA), which are internalized by ECs and M1-type MΦ, leading to inhibition of inflammatory signaling pathways (NF-κB and MAPK p38α and ERK1/2) and reduced monocyte adhesion.

b) Bio-LN/SPM – pro-resolving effect, via induction of an M2 phenotype in macrophages, decreased inflammatory markers, and reduced lipid deposits in the atherosclerotic plaque (Figure 2).

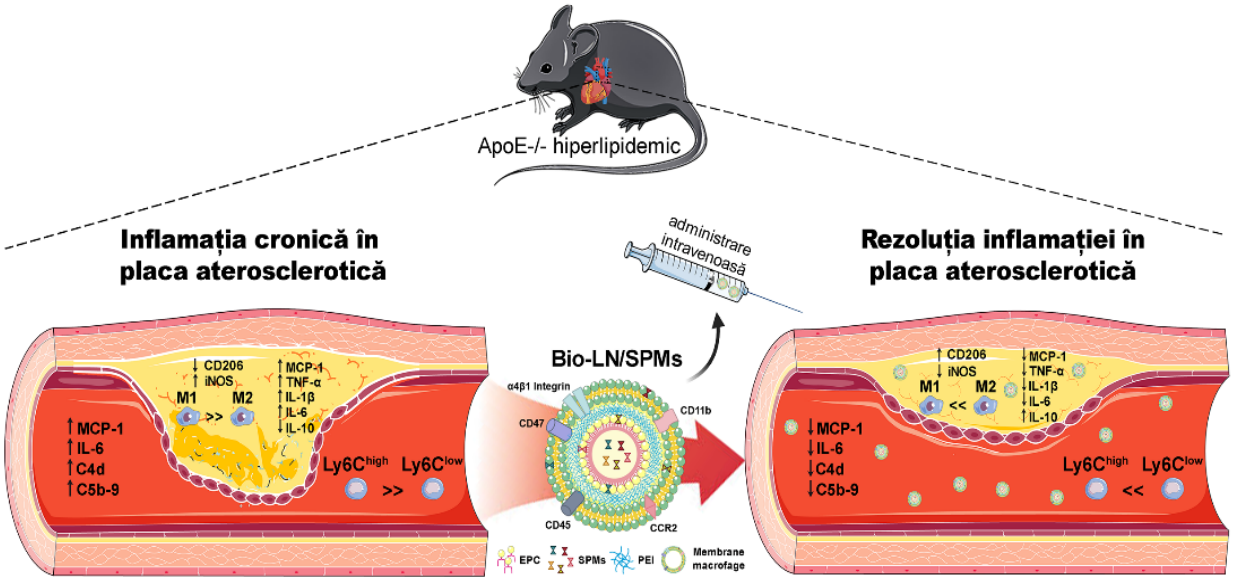


Figure 2. Schematic representation of the nanotherapeutic strategy developed in the second study to promote the resolution of vascular inflammation associated with AS. The effect of biomimetic nanoparticles loaded with specialized pro-resolving mediators (Bio-LN/SPM) on ECs, vascular SMCs, and MΦ in the hyperlipidemic ApoE−/− murine model is illustrated. Treatment with Bio-LN/SPM results in reduced expression of circulating and local inflammatory markers, induction of a reparative phenotype in MΦ, and decreased lipid accumulation in atherosclerotic lesions.

2. Confirmation of the role of inflammation resolution in AS control and validation of SPMs as viable therapeutic agents in cardiovascular nanomedicine.

E. General conclusions

This thesis makes a significant contribution to understanding and treating chronic vascular inflammation in the context of AS, proposing two complementary nanotherapeutic approaches. While MNP-Dex/PCA inhibit pro-atherogenic inflammatory pathways, Bio-LN/SPM actively promote inflammation resolution—a key process largely overlooked in current treatments. Through these strategies, the work demonstrates the applicability of nanomedicine in personalized cardiovascular therapy, opening new avenues for early and targeted intervention in AS.

F. References

1. Ahmad, M. Z., Bhatnagar, D., Ladhe, S., Kumar, D., Pathak, K., Das, R. J., Sarma, H., & Mustafa, G. (2022). Liposomes and Niosomes for Targeted Drug and Gene Delivery Systems. In *Nanotechnology in the Life Sciences*. https://doi.org/10.1007/978-3-031-12658-1_12
2. Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 5). https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087
3. d'Aiello, A., Filomia, S., Brecciaroli, M., Sanna, T., Pedicino, D., & Liuzzo, G. (2024). Targeting Inflammatory Pathways in Atherosclerosis: Exploring New Opportunities for Treatment. *Current Atherosclerosis Reports*, *26*(12), 707–719. https://doi.org/10.1007/s11883-024-01241-3
4. Fredman, G. (2019). Can Inflammation-Resolution Provide Clues to Treat Patients According to Their Plaque Phenotype? *Frontiers in Pharmacology*, *10*(MAR). https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00205
5. Fredman, G., & Serhan, C. N. (2024). Specialized pro-resolving mediators in vascular inflammation and atherosclerotic cardiovascular disease. In *Nature Reviews Cardiology*. https://doi.org/10.1038/s41569-023-00984-x
6. Institutul Național de Sănătate Publică. (2024). *Analiză de situație privind problematica bolilor cardiovasculare*.

EFFICIENCY AND DISSEMINATION OF RESEARCH

Papers published in ISI-indexed international journals (12 papers)

First author (5):

1. **Anghelache, M.**, Turtoi, M., Petrovici, A.R., Fifere, A., Pinteala, M., Calin, M., 2021. Development of Dextran-Coated Magnetic Nanoparticles Loaded with Protocatechuic Acid for Vascular Inflammation Therapy. Pharmaceutics 13, 1414. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091414. **Impact factor at the time of publication (2021): 4.9.**

2. Turtoi, M.#, **Anghelache, M.**#, Bucatariu, S.-M., Deleanu, M., Voicu, G., Safciuc, F., Manduteanu, I., Fundueanu, G., Simionescu, M., Calin, M., 2021. A novel platform for drug testing: Biomimetic three-dimensional hyaluronic acid-based scaffold seeded with human hepatocarcinoma cells. International Journal of Biological Macromolecules 185, 604–619. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.174. **Impact factor at the time of publication (2021): 7.7.**

3. Movileanu, C.#, **Anghelache, M.**#, Turtoi, M., Voicu, G., Neacsu, I.A., Ficai, D., Trusca, R., Oprea, O., Ficai, A., Andronescu, E., Calin, M., 2022. Folic acid-decorated PEGylated magnetite nanoparticles as efficient drug carriers to tumor cells overexpressing folic acid receptor. International Journal of Pharmaceutics 625, 122064. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122064. **Impact factor at the time of publication (2022): 5.3.**

4. **Anghelache, M.**, Voicu, G., Deleanu, M., Turtoi, M., Safciuc, F., Anton, R., Boteanu, D., Fenyo, I.M., Manduteanu, I., Simionescu, M., Calin, M., 2024. Biomimetic Nanocarriers of Pro-Resolving Lipid Mediators for Resolution of Inflammation in Atherosclerosis. Adv Healthcare Materials 13, 2302238. https://doi.org/10.1002/adhm.202302238. **Impact factor at the time of publication (2024): 10.**

5. **Anghelache, M.**, Voicu, G., Anton, R., Safciuc, F., Boteanu, D., Deleanu, M., Turtoi, M., Simionescu, M., Manduteanu, I., Calin, M., 2025. Inflammation resolution-based treatment of atherosclerosis using biomimetic nanocarriers loaded with specialized pro-resolving lipid mediators. Materials Today Bio 32, 101733. https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2025.101733. **Impact factor at the time of publication (2021): 8.7.**

# - authors with equal contribution

Co-author (7):

1. Turtoi, M., **Anghelache, M.**, Patrascu, A.A., Maxim, C., Manduteanu, I., Calin, M., Popescu, D.-L., 2021. Synthesis, Characterization, and In Vitro Insulin-Mimetic Activity Evaluation of Valine Schiff Base Coordination Compounds of Oxidovanadium(V). Biomedicines 9, 562. https://doi.org/10.3390/biomedicines9050562. **Impact factor at the time of publication (2021): 3.9.**

2. Popescu, I., Turtoi, M., Suflet, D.M., Dinu, M.V., Darie-Nita, R.N., **Anghelache, M.**, Calin, M., Constantin, M., 2021. Alginate/poloxamer hydrogel obtained by thiol-acrylate photopolymerization for the alleviation of the inflammatory response of human keratinocytes. International Journal of Biological Macromolecules 180, 418–431. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.082. **Impact factor at the time of publication (2021): 7.7.**

3. Fundueanu, G., Constantin, M., Turtoi, M., Bucatariu, S.-M., Cosman, B., **Anghelache, M.**, Voicu, G., Calin, M., 2022. Bio-Responsive Carriers for Controlled Delivery of Doxorubicin to Cancer Cells. Pharmaceutics 14, 865. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040865. **Impact factor at the time of publication (2022): 4.9.**

4. Turtoi, M., **Anghelache, M.**, Patrascu, A.A., Deleanu, M., Voicu, G., Raduca, M., Safciuc, F., Manduteanu, I., Calin, M., Popescu, D.-L., 2022. Antitumor Properties of a New Macrocyclic Tetranuclear Oxidovanadium(V) Complex with 3-Methoxysalicylidenvaline Ligand. Biomedicines 10, 1217.

https://doi.org/10.3390/biomedicines10061217. **Impact factor at the time of publication (2022): 3.9.**

5. Voicu, G., Mocanu, C.A., Safciuc, F., **Anghelache, M.**, Deleanu, M., Cecoltan, S., Pinteala, M., Uritu, C.M., Droc, I., Simionescu, M., Manduteanu, I., Calin, M., 2023. Nanocarriers of shRNA-Runx2 directed to collagen IV as a nanotherapeutic system to target calcific aortic valve disease. Materials Today Bio 20, 100620. https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100620. **Impact factor at the time of publication (2023): 8.7.**

6. Voicu, G., Mocanu, C.A., Safciuc, F., Rebleanu, D., **Anghelache, M.**, Cecoltan, S., Droc, I., Simionescu, M., Manduteanu, I., Calin, M., 2024. VCAM-1 targeted nanocarriers of shRNA-Smad3 mitigate endothelial-to-mesenchymal transition triggered by high glucose concentrations and osteogenic factors in valvular endothelial cells. International Journal of Biological Macromolecules 281, 136355. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136355. **Impact factor at the time of publication (2024): 7.7.**

7. Motelica, L., Voicu, G., Chircov, C., Surdu, A.V., Trusca, R.D., Vasile, B.S., Ficai, D., Oprea, O.C., Marta, D.S., Peteu, V.-E., **Anghelache, M.**, Ficai, A., Calin, M., 2025. Aspartic acid functionalized magnetic nanoparticles for enhanced internalization in tumoral cell. J Aust Ceram Soc 61, 265–283. https://doi.org/10.1007/s41779-024-01102-x. **Impact factor at the time of publication (2021): 1.8.**

Abstracts published in ISI-indexed journals – 4 (1 first author)

1. **Anghelache, M.**, Deleanu, M., Anton, R., Turtoi, M., Voicu, G., Mândușeanu, I., Simionescu, M., Călin, M., 2023. Pro-resolving lipid mediator-loaded biomimetic nanoparticles as promising carriers for inflammation resolution in atherosclerosis. Talks. FEBS Open Bio 13, 2–60. https://doi.org/10.1002/2211-5463.13645.

2. Voicu, G., **Anghelache, M.**, Deleanu, M., Turtoi, M., Safciuc, F., Anton, R., Mândușeanu, I., Simionescu, M., Călin, M., 2023. Dual targeting of resolvins-loaded nanoparticles to VCAM-1 and collagen IV assure their delivery to the aorta of

atherosclerotic mice, 2023. FEBS Open Bio 13, 61–258. https://doi.org/10.1002/2211-5463.13646

3. Boteanu, D., **Anghelache, M.**, Turtoi, M., Călin, M., 2025. Enhancing tumor drug delivery: targeting nucleolin with liposomes for improved therapeutic efficacy. SEE J Immunol 8, 067. https://doi.org/10.3889/seejim.2025.6130.

4. Turtoi, M., **Anghelache, M.**, Voicu, G., Safciuc, F., Deleanu, M., Călin, M., 2025. Innovative vanadium (V)-based drug: preliminary in vitro and in vivo antitumor investigations. SEE J Immunol 8, 078. https://doi.org/10.3889/seejim.2025.6141.

REGISTERED PATENTS

1. Patent application no. A/00388, filed with the State Office for Inventions and Trademarks (OSIM) on 20.07.2023, titled "Smart magnetic nanosystems for cellular vectorization of bioactive compounds", authors: Movileanu C., Ficai D., Ficai A., Calin M., **Anghelache M.**, Gafencu A., Fundueanu-Constantin G., Pinteala M., Simionescu M., Andronescu E.
(https://osim.ro/images/Publicatii/Inventii/2025/bopi_inv_01_2025.pdf).

PRESENTATIONS AT INTERNATIONAL SCIENTIFIC EVENTS:

Oral Presentations (3):

1. **Maria Anghelache**, Preparation and characterization of macrophage-membrane coated nanoemulsions for delivery of specialized pro-resolving lipid mediators of inflammation, 38th Annual Scientific Session of The Romanian Society for Cell Biology, 4 November 2021.

2. **Maria Anghelache**, Pro-resolving Lipid Mediators-loaded Biomimetic Nanoparticles as Promising Carriers for Inflammation Resolution in Atherosclerosis, The 47th FEBS Congress, Oral presentation, Tours, France, 8-12 July 2023.

3. **Maria Anghelache**, Macrophage Membranes-Functionalized Lipid Nanoemulsions as Promising Carriers of Pro-Resolving Lipid Mediators to Atherosclerotic Lesions, 40th Annual Scientific Session of The Romanian Society for Cell Biology, Oral presentation, 16-17 November 2023.

Posters (5):

1. **Maria Anghelache**, Florentina Safciuc, Geanina Voicu, Mihaela Turtoi, Cornelia Ioana Ilie, Anton Ficai, Manuela Calin, Chitosan-coated iron oxide nanoparticles as a promising nanocarriers for gallic acid targeted delivery, "International Conferences & Exhibition on Nanotechnologies, Organic Electronics & Nanomedicine", Thessaloniki, 06-09 July 2021.
2. **Maria Anghelache**, Mariana Deleanu, Mihaela Turtoi, Geanina Voicu, Manuela Calin, Preparation and physico-chemical characterization of specialized pro-resolving lipid mediators (SPMs)-loaded nanoemulsions as nanocarriers for inflammation resolution, "International Conferences & Exhibition on Nanotechnologies, Organic Electronics & Nanomedicine", Thessaloniki, 6-9 July 2021.
3. **Maria Anghelache**, Mariana Deleanu, Mihaela Turtoi, Geanina Voicu, Manuela Calin, Development of Biomimetic Nanocarriers for delivery of Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators (SPMs) to atherosclerotic plaque, "Materials, Methods & Technologies", Burgas, Bulgaria, 19-22 August 2022.
4. **Maria Anghelache**, Mariana Deleanu, Ruxandra Anton, Mihaela Turtoi, Geanina Voicu, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Development of Biomimetic Nanocarriers for Delivery of Pro-Resolving Mediators to Atherosclerotic Plaque, "The 39th Annual Scientific Session of The Romanian Society for Cell Biology", 21-23 October 2022.
5. **Maria Anghelache**, Mariana Deleanu, Ruxandra Anton, Mihaela Turtoi, Geanina Voicu, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Specialized pro-resolving mediators (SPMs)-loaded Nanoemulsions as promising biomimetic nanocarriers for inflammation resolution, The 47th FEBS Congress, Tours, France, 8-12 July 2023.

AWARDS OBTAINED DURING THE DOCTORAL PROGRAM

1. **Gold Medal –** Smart nanoparticle systems for cellular internalization, Authors: Movileanu C., Ficai D., Ficai A., Calin M., **Anghelache M.**, Gafencu A., Fundueanu-

Constantin G., Pinteala M., Simionescu M., Andronescu E.; Traian Vuia International Exhibition of Inventions and Innovations, 12–14 October 2021, Timișoara, Romania.

2. **Gold Medal** – Smart nanoparticle systems for cellular internalization, Authors: Movileanu C., Ficai D., Ficai A., Calin M., **Anghelache M.**, Gafencu A., Fundueanu-Constantin G., Pinteala M., Simionescu M., Andronescu E.; International Exhibition of Scientific Research, Innovation and Inventions "PRO INVENT" – 19th Edition, 20–22 October 2021, Cluj-Napoca, Romania.
3. **Gold Medal –** Inventions, Plant Varieties, Industrial Design – Smart nanoparticle systems for cellular internalization**,** Autori: Movileanu C., Ficai D., Ficai A., Calin M., **Anghelache M.**, Gafencu A., Fundueanu-Constantin G., Pinteala M., Simionescu M., Andronescu E.; International Specialized Exhibition "INFOINVENT 2021" – 17th Edition, 17–20 November 2021, Chișinău, Republic of Moldova.

SPECIALIZATIONS AND COURSES COMPLETED DURING THE DOCTORAL PROGRAM

1. The course „**Flow Cytometry Training School**". Romanian Cytometry Association, Bucharest, 14–15 December 2020.
2. 9th International Lab Animal Course Crete (**FELASA**), Crete, Heraklion, May–June 2023.
3. **Secondment – CARDIOSCOPE:** "Comprehensive and personalized assessment of acute coronary syndrome by multiomic approach and artificial intelligence strategy", HORIZON-MSCA-2021-SE-01, Multimedica, Milan, 12 March – 11 April 2025.

SCHOLARSHIPS OBTAINED DURING THE DOCTORAL PROGRAM

1. Doctoral scholarship: Romanian Academy (SCOSAAR): 2020–2025
2. Scholarship for participation in the FEBS Congress (2023)

COLABORĂRI ÎN PROIECTE DE CERCETARE

1. **PN-II-P4-ID-PCE-2020-2465** – "Targeted nanocarrier-based therapy for inflammation resolution in atherosclerosis (NANORES)", project director Dr. Manuela Calin.
2. **PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697** – "Smart therapies for non-communicable diseases, based on controlled release of pharmacological compounds from encapsulated cells after genetic manipulation or targeted bionanoparticles (INTERA)", project director: Acad. Maya Simionescu, component project 3 "Smart nanobioparticles designed for the vectorization of bioactive compounds for vascular inflammation therapy" coordinator: Dr. Manuela Calin.
3. **PNRR-III-C9-2022-I8-CF93** – "New nanotherapeutic strategies targeting mechanisms involved in fibroblast-to-myofibroblast transition for the treatment of cardiac fibrosis (HeartCure)", project director Dr. Rostyslav Billy, scientific coordinator of the host institution Dr. Manuela Calin.
4. **ERANET-NANOTECMEC-Ctr. nr. 92/2025** – "Nanovehicles for Ago/antagomiR delivery used for immunomodulation: a potential approach in cancer and lung transplant therapy (SAIL)", project director Dr. Rostyslav Billy.
5. **H2020-EU.1.2.-AMD-861878-17 (2025)** – „Development of "smart" amplifiers of reactive oxygen species specific to aberrant polymorphonuclear neutrophils for treatment of inflammatory and autoimmune diseases, cancer and myeloablation (NeutroCure)", project director Prof. Dr. Andriy Mokhir.

ROMANIAN ACADEMY
School of Advanced Studies of the Romanian Academy
Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu"

PhD THESIS SUMMARY

Study of the role of the hypoxamiR miR-210 in the inflammatory response using transgenic mouse models to identify common targets in hypoxia and inflammation.

PhD COORDINATOR:
Dr. CS I ALEXANDRINA BURLACU

PhD STUDENT:
CARMEN-ALEXANDRA NECULACHI

2026

Table of Contents

Contents.....1

List of Abbreviations.....7

Introduction.....11

I. State of the Art.....14

1. Hypoxia and its role as a mediator of inflammatory response.....15

1.1 HIF transcription factor as central mediator in adaptation to hypoxia.....15

1.2 Cellular components involved in modulation of inflammation.....20

1.3 Interaction between hypoxia and inflammation: central role of macrophages.....36

2. Non-coding RNA and its role in control of cellular functions.....44

2.1 Classification of non-coding RNAs.....44

2.2 MicroRNAs: general characteristics and biogenesis.....46

2.3 Mechanisms of action of microRNAs.....53

2.4 MicroRNAs as regulators of inflammatory response.....55

3. miR-210 at the interface between hypoxia and inflammation.....58

3.1 miR-210 as molecular regulator of cellular adaptation to hypoxia.....58

3.2 miR-210 as mediator of response to hypoxia in inflammatory context.....66

II. Original Contributions.....70

1. Characterization of transgenic mouse models for miR-210 study.....71

1.1 Introduction and objectives.....71

1.2 Materials and methods.....73

1.3 Characterization of mice with miR-210 deletion.....77

1.4 Characterization of mice with conditional miR-210 overexpression.....81

1.5 Discussion.....88

1.6 Limitations and perspectives.....89

2. Transcriptomic and functional changes in fibroblasts with miR-210 deletion.....90

2.1 Introduction and objectives.....90

2.2 Materials and methods.....91

2.3 Results.....96

2.4 Discussion.....108
2.5 Partial conclusions.....109
2.6 Limitations and perspectives.....110
3. Behavior of mesenchymal stromal cells in inflammation and hypoxia.....111
3.1 Introduction and objectives.....111
3.2 Materials and methods.....112
3.3 Results.....115
3.4 Discussion.....126
3.5 Partial conclusions.....127
3.6 Limitations and perspectives.....128
4. Role of miR-210 in modulation of macrophage function in inflammation.....129
4.1 Introduction.....129
4.2 Materials and methods.....130
4.3 Results.....142
4.4 Discussion.....163
4.5 Partial conclusions.....164
4.6 Limitations and perspectives.....165
5. Impact of miR-210 deletion on the transcriptome in HEK293T cells.....166
5.1 Introduction and objectives.....166
5.2 Materials and methods.....167
5.3 Results.....175
5.4 Discussion.....186
General Conclusions.....190
Bibliography.....192

I. Abstract

Keywords: miR-210, macrophages, fibroblasts, HEK, mesenchymal stem cells, inflammation, hypoxia.

Total number of pages – 211

Number of figures in Part I – 22

Number of tables in Part I – 1

Number of figures in Part II – 74

Number of tables in Part II – 8

Bibliographic references – 244

Publications in ISI-indexed journals during doctoral training – 8 (1 first author)

Posters presented at international scientific events – 3 (first author)

Oral presentations at international scientific events – 1 (first author)

Scholarships obtained during doctoral program – 2

Participation in research projects – 3

II. Introduction and Objectives

Non-coding ribonucleic acids (ncRNAs) represent essential components of genomic regulatory architecture, participating in the control of gene expression at epigenetic, transcriptional, and post-transcriptional levels (Esteller, 2011; Statello et al., 2021). MicroRNAs (miRs) constitute a subclass of small ncRNAs (≈21–23 nucleotides) that regulate gene expression post-transcriptionally through interaction with the 3′UTR region of target messenger RNAs, leading to translational repression and/or transcript degradation (Bartel, 2009; He and Hannon, 2004). Through partial complementarity, a single miR can simultaneously modulate the expression of multiple transcripts, contributing to fine-tuning of gene expression programs.

Hypoxia represents a stress condition of major pathophysiological relevance, present in acute and chronic inflammation, tissue ischemia, and cardiovascular pathology (Eltzschig and

Carmeliet, 2011; Colgan et al., 2020). Cellular response to reduced oxygen availability is coordinated by hypoxia-inducible factors (HIF), which modulate the expression of genes involved in energy metabolism, angiogenesis, and cell survival (Semenza, 2012; Bakleh and Al Haj Zen, 2025). HIF stabilization (Epstein et al., 2001; Bruick and McKnight, 2001) triggers an adaptive transcriptional program characterized by metabolic reprogramming and adjustment of mitochondrial function.

In this context, miR-210 has been identified as a central regulator of cellular response to hypoxia, being directly controlled by HIF through binding to evolutionarily conserved hypoxia-responsive elements (HRE) (Chan et al., 2012; Semenza, 2012). Functionally, miR-210 modulates the expression of genes involved in mitochondrial metabolism, angiogenesis, DNA repair, and cell cycle regulation, contributing to the integration of metabolic adaptation with cell survival mechanisms under hypoxic conditions (Chan et al., 2009; Devlin et al., 2011; He et al., 2012). The genomic organization of the miR-210 locus, located within an intron of the MIR210HG gene, suggests a possible functional interdependence between miR-210 and its genomic context.

Most available studies have utilized models of transient overexpression or inhibition, without systematically evaluating the consequences of complete genomic deletion of the miR-210 locus. This limitation is relevant in the context of three-dimensional genome organization and the existence of topologically associated domains (TAD), where perturbation of a genomic locus can generate widespread transcriptomic effects beyond the targeted sequence (Dixon et al., 2012; Nora et al., 2012; Engreitz et al., 2016).

Based on these considerations, in this thesis we aimed to investigate the link between hypoxia-induced signaling and inflammation, specifically evaluating the role of the miR-210 genomic locus in relevant inflammatory contexts. The doctoral thesis is based on the hypothesis that genomic deletion of the miR-210 locus determines perturbations in transcriptomic networks involved in cellular adaptation to hypoxia, through mechanisms that could reflect both the absence of mature miR-210 and disruption of the local genomic context associated with the MIR210HG locus. In this context, the main goal of the thesis was, on one hand, to investigate the functional and transcriptomic consequences of miR-210 deletion at the cellular level, and on the other hand, to investigate the consequences of miR-210 locus manipulation on genomic stability. To achieve this goal, the following specific objectives were established: (i)

characterization of transgenic mice (mice with constitutive miR-210 deletion and mice with inducible miR-210 overexpression); (ii) generation and validation of cellular models with miR-210 locus deletion; (iii) comparative evaluation of transcriptomic response in WT and miR-210 KO cells; (iv) identification of genes and biological pathways modified following miR-210 deletion or MIR210HG locus disruption; (v) analysis of the impact of deletion on functional effects of miR-210 locus loss.

The novelty of this thesis consists in the systematic analysis of the effects of complete genomic deletion of the miR-210 locus under normoxic and hypoxic conditions, in an experimental framework that allows distinguishing between the consequences of loss of the mature miR and possible effects associated with perturbation of the local genomic context (MIR210HG). The thesis demonstrates that the miR-210 locus functions in interaction with adjacent genetic elements and underscores the importance of considering genomic localization and structural characteristics of each non-coding RNA locus in loss-of-function experiments performed through genome editing technologies.

Furthermore, evaluation of these effects in physiologically relevant primary cells (fibroblasts, macrophages, HEK cells) strengthens the biological relevance of the observations and provides a robust interpretative framework for the identified transcriptomic changes. By integrating transgenic mouse models, primary cells, and genetically modified cell lines, the thesis proposes a unified perspective on the role of miR-210 at the interface between hypoxia and inflammation.

III. Thesis Structure

The doctoral thesis is structured in two major parts:

Part I – State of the Art comprises an analysis of the specialized literature regarding the role of hypoxia in regulating cellular response, the functional interaction between hypoxia and inflammation, as well as post-transcriptional regulation mechanisms mediated by non-coding RNAs, with emphasis on microRNAs and, particularly, on miR-210. This part is structured in three main chapters, which provide the theoretical framework necessary for developing the experimental directions of the thesis. In **Chapter 1**, the molecular mechanisms through which hypoxia modulates inflammatory response are presented, with emphasis on the role of

hypoxia-inducible factors and their interaction with inflammatory signaling pathways. Multiple cell types involved in inflammation are analyzed, including macrophages, fibroblasts, and mesenchymal stromal cells, as well as how these respond to hypoxic stress (Davidson et al., 2021; Bernardo and Fibbe, 2013). The chapter highlights that hypoxia and inflammation represent interdependent biological processes, which mutually influence each other through common molecular and cellular mechanisms. **Chapter 2** presents the general mechanisms of post-transcriptional regulation mediated by ncRNAs, with emphasis on their classification and the role of microRNAs in controlling gene expression. The processes of microRNA biogenesis are described (Bartel, 2004), their mechanisms of action and impact on transcriptomic networks, underscoring their role in fine-tuning of biological processes, including in contexts of cellular stress such as hypoxia and inflammation. **Chapter 3** is dedicated to the analysis of miR-210, considered a central regulator of response to hypoxia. The mechanisms of miR-210 expression regulation by HIF are presented, the genomic organization of the MIR210HG locus and its functions in controlling cellular processes, including mitochondrial metabolism, angiogenesis, genomic stability, and immune response regulation. The chapter highlights the role of miR-210 as an integrator element of hypoxic and inflammatory signaling. Through integration of these chapters, a conceptual framework is outlined in which miR-210 is positioned at the interface between hypoxia and inflammation, constituting a potential key regulator of cellular adaptation to stress.

Part II – Original Contributions is dedicated to experimental studies conducted to investigate the role of miR-210 and its genomic locus in regulating cellular response to hypoxia and inflammation, utilizing transgenic mouse models and multiple physiologically relevant cell types. **Chapter 1** is dedicated to the characterization of transgenic mouse models used in the studies. The mice were obtained from our collaborators, the miR-210 OE model from Prof. Dr. Fabio Martelli (Policlinico San Donato, Italy), and the miR-210 KO model from Prof. Dr. Mircea Ivan (Indiana University, USA). The strategies for generating the animal models (constitutive deletion, respectively inducible overexpression of miR-210) and methods for characterization and molecular validation of the two lines are presented. This chapter establishes the experimental framework necessary for investigating the consequences of miR-210 loss or overexpression in vivo and ex vivo. **Chapter 2** analyzes the role of miR-210 in fibroblasts, with emphasis on transcriptomic and functional changes associated with its

deletion. Cellular responses are investigated under normoxic and hypoxic conditions, highlighting the impact on proliferation and metabolic adaptation processes. **Chapter 3** analyzes the behavior of mesenchymal stromal cells under conditions of inflammation and hypoxia, with emphasis on survival, proliferation, and activation of immunomodulatory programs. The effects of pro-inflammatory stimuli on cell viability, expression of genes involved in immunomodulatory function, and nitric oxide production are evaluated. Furthermore, the impact of the association between inflammation and hypoxia on MSC survival is investigated, highlighting that this microenvironment negatively affects the homeostasis and function of these cells. **Chapter 4** investigates the role of miR-210 in macrophages, with emphasis on their polarization and regulation of inflammatory response. miR-210 KO macrophages are analyzed, highlighting the disruption of anti-inflammatory polarization and favoring of a pro-inflammatory phenotype in the absence of miR-210. **Chapter 5** is dedicated to the study of the role of the miR-210 genomic locus in human cell lines (HEK293T) modified by genome editing. The consequences of deletion on gene expression and cellular processes are analyzed, including proliferation, mitotic spindle organization, and genomic stability. The results suggest that the observed effects are not limited to the absence of mature miR-210, but also reflect perturbation of the genomic context of the MIR210HG locus.

Thus, the structure of this part reflects a progressive approach, from validation of experimental models to functional and transcriptomic analysis in different cell types. Integration of the obtained results highlights that miR-210 acts as a regulator of cellular adaptation to hypoxia and of inflammatory response, and the effects of its deletion cannot be attributed exclusively to the loss of the mature miR, but also include consequences associated with perturbation of the genomic context of the MIR210HG locus.

IV. Principal Results

Chapter 1. Characterization of Transgenic Mouse Models for miR-210 Study

An important first result of the thesis was represented by validation and characterization of the two transgenic mouse models used for studying miR-210 function: the constitutive miR-210

deletion model (miR-210 KO) and the inducible miR-210 overexpression model (miR-210 OE). In the case of the miR-210 KO model, genotyping allowed clear differentiation of WT, heterozygous, and homozygous animals, based on the PCR products obtained; and the absence of miR-210 expression was confirmed by RT-qPCR in both the left ventricle and macrophages derived from bone marrow.

In parallel, the miR-210 OE model allowed controlled induction of miR-210 expression through the Tet-On system, with integration of the transgene at the ROSA26 locus. Doxycycline administration resulted in significant increase in miR-210 expression in heart and skeletal muscle, in a dose-dependent manner, confirming the functionality of the model in vivo. However, studies conducted on cells isolated from these animals revealed the transient nature of overexpression and the inability to efficiently reactivate the Tet-On system in culture, suggesting the existence of specific constraints of the in vivo environment. Overall, this chapter provided the experimental models and methodology necessary for evaluating the role of miR-210 in different cell types and biological contexts.

Chapter 2. Transcriptomic and Functional Changes in Fibroblasts with miR-210 Deletion

In this chapter, the impact of miR-210 deletion on metabolism and function of fibroblasts was studied, using mouse dermal fibroblasts isolated from transgenic mice. Validation of deletion demonstrated complete absence of miR-210 expression in KO fibroblasts, both in normoxia and in hypoxia, while WT fibroblasts showed pronounced induction of miR-210 under hypoxic conditions. Comparative transcriptomic analysis of miR-210 KO fibroblasts highlighted significant changes in biological pathways associated with oxidative phosphorylation, glycolysis, fatty acid metabolism, mTORC1 signaling, and response to hypoxia, supporting the role of miR-210 in integrating metabolic adaptation to hypoxic stress.

A notable result was the identification of expression changes at the level of genes located in genomic proximity to the miR-210 locus, including Rassf7, Rnh1, Taldo1, and Cd151, suggesting that deletion of this locus can affect not only the function of the mature microRNA, but also local transcriptional regulation within the genomic domain containing it.

From a functional perspective, miR-210 KO fibroblasts showed significant reduction in maximal respiratory capacity and mitochondrial respiratory reserve (Figure 1a), as well as

increased mitochondrial ROS in hypoxia. Furthermore, cell cycle analysis revealed redistribution of cells between cell cycle phases, characterized by accumulation in S phase and reduction of the proportion of cells in G0/G1 phase, suggesting dysregulation of the G1/S transition and disruption of correct cell cycle progression, associated with diminished cell proliferation rate (Figure 1b). These data demonstrate that miR-210 contributes to maintenance of mitochondrial homeostasis, redox balance, and correct cell cycle progression in fibroblasts, especially under hypoxic stress conditions.

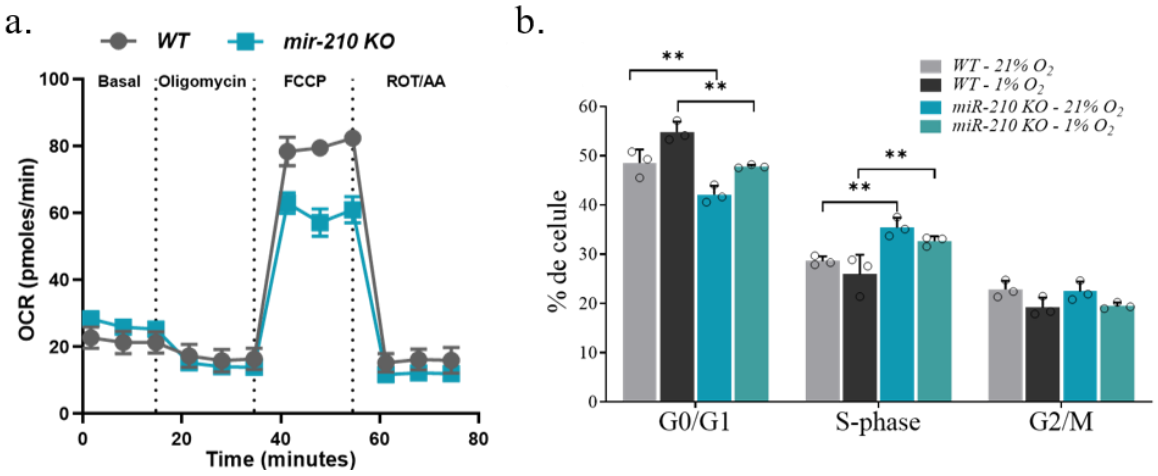


***Figure 1**. OCR profile in WT and miR-210 KO fibroblasts and cell cycle analysis in WT and miR-210 KO fibroblasts under normoxia (21% O_2) and hypoxia (1% O_2). (a) Temporal representation of OCR dynamics measured by Seahorse Mito Stress test under basal conditions and after addition of inhibitors. (b) Quantitative representation of the percentage of cells in G0/G1, S, and G2/M phases. Data are expressed as mean ± SD. Statistical analysis: two-way ANOVA; **p < 0.01. (Figure adapted from Preda et al., 2025)*

Chapter 3. Behavior of Mesenchymal Stromal Cells in Inflammation and Hypoxia

This chapter aimed to investigate how the inflammatory and hypoxic microenvironment influences the phenotype and survival of mesenchymal stromal cells (MSC), considering their central role in regulating inflammation and tissue regeneration. The results showed that inflammatory stimulation activates the immunomodulatory programs of MSC, evidenced by increased expression of IDO1, NOS2, and COX2 genes. At the same time, TNF-α inhibited

proliferation in a dose-dependent manner, and the association of TNF-α and IFN-γ amplified this effect, inducing morphological changes compatible with cellular stress and cell death.

An important result was the demonstration that inflammatory activation of MSC is accompanied by a significant increase in nitric oxide production, and inhibition of NOS2 partially ameliorated cell viability, suggesting the involvement of excess NO in the observed cytotoxicity. Under moderate hypoxic conditions, MSC initially maintained viability; however, the association of hypoxia with inflammatory stimuli resulted in pronounced reduction of cell survival. Overall, the obtained data show that the interaction between inflammation and hypoxia compromises MSC function and viability, through excessive activation of NOS2-dependent pathways and through disruption of redox homeostasis. These results underscore the importance of optimizing preconditioning and culture conditions for therapeutic use of MSC in inflammatory and hypoxic contexts.

Chapter 4. Role of miR-210 in Modulating Macrophage Function in Inflammation

In this chapter, the role of miR-210 in regulating the function of bone marrow-derived macrophages was analyzed, with emphasis on functional polarization, metabolic profile, and inflammatory response. Monocytes isolated from bone marrow were differentiated into M0 macrophages and subsequently polarized toward the M2 phenotype. The analyses performed showed that macrophages from miR-210 KO mice present an accentuated inflammatory profile in the basal state and a deficient transition toward the M2 phenotype. Transcriptomic analysis indicated significant changes in gene expression in both M0 and M2 macrophages, and bioinformatic analyses highlighted activation of pathways involved in response to oxidative stress, hypoxia, and inflammation, concomitantly with reduced expression of genes associated with interferon-dependent response and IL-6/STAT3 signaling (Figure 2a,b).

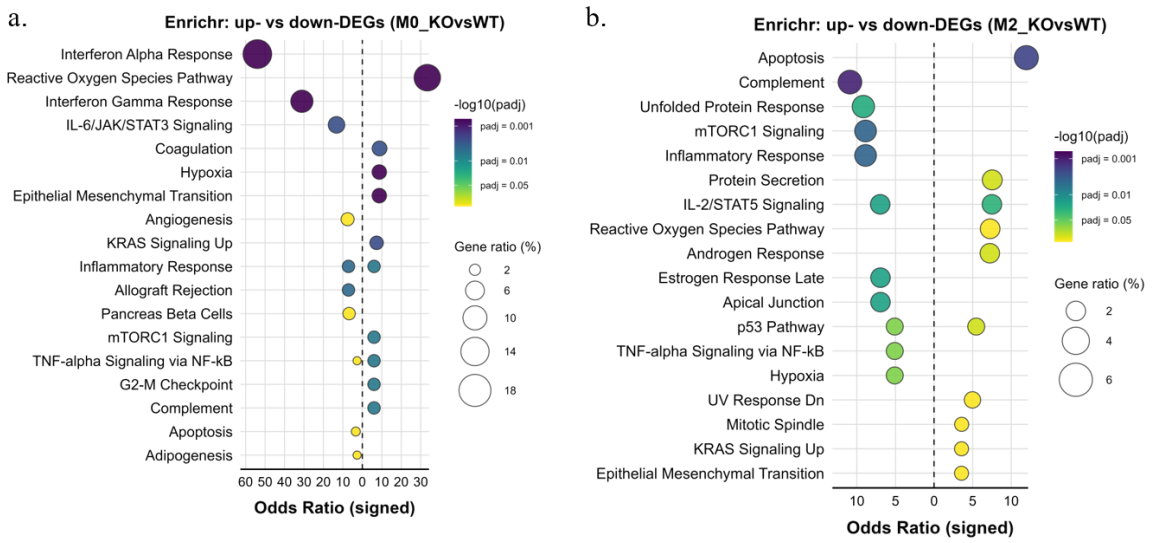


Figure 2. *Effects of miR-210 deletion in M0 and M2 macrophages. Dot-plot representations obtained with the Enrichr platform, highlighting biological pathways significantly enriched among differentially expressed genes (DEG) between macrophages from miR-210 KO and WT mice: (a) in M0-type macrophages and (b) in M2-type macrophages (adapted from Neculachi et al., 2025).*

These results were functionally confirmed by increased secretion of IL-6, TNF-α, and IL-1β in miR-210 KO M0 macrophages and by accumulation of pro-IL-1β precursor, indicating intrinsic inflammatory activation in the absence of this microRNA. Under M2 polarization conditions, KO macrophages showed incomplete reprogramming, with reduction of M2 markers, activation of pro-apoptotic pathways, and increased susceptibility to apoptosis following TNF-α stimulation. Furthermore, increased levels of p53, TGF-β, and MMP-9 proteins were demonstrated, suggesting activation of programs associated with cellular stress and tissue remodeling. Metabolic analysis showed that M0 KO macrophages have reduced basal glycolytic activity, and functional tests demonstrated increased phagocytic and efferocytic activity (Figure 3a,b). Overall, the results demonstrate that miR-210 acts as an integrative regulator of metabolism and inflammation in macrophages, contributing to maintenance of balance between inflammatory activation, survival, and alternative polarization

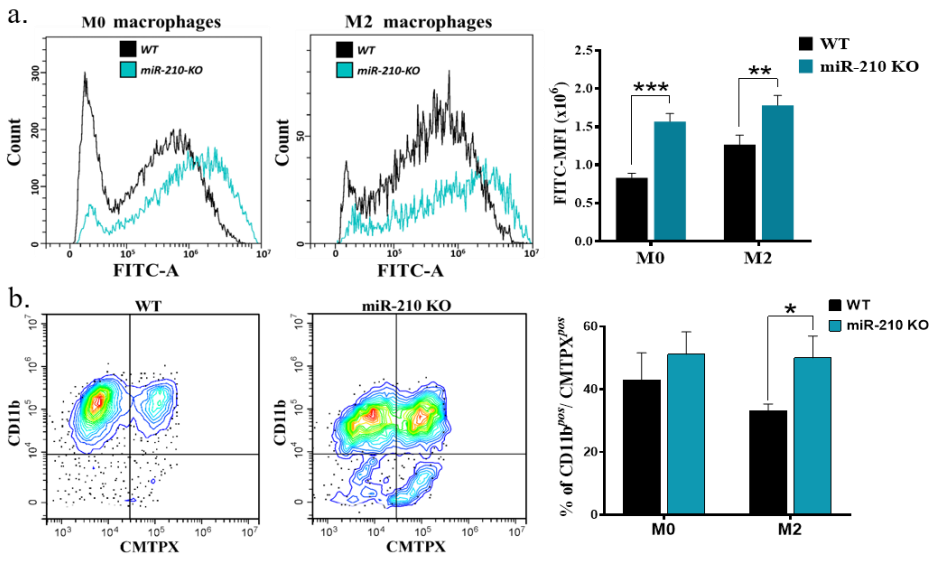


Figure 3. *Functional characterization of miR-210 KO macrophages. (a) Phagocytic capacity of M0 and M2 macrophages (flow cytometry), quantified as FITC-MFI (n = 6/condition). (b) Efferocytic capacity of WT and miR-210 KO macrophages, quantified as percentage of CD11b⁺CMTPX⁺ cells under M0 and M2 conditions (n=3/condition). Data are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis: two-way ANOVA, **p < 0.01, ***p < 0.001 (adapted from Neculachi et al., 2025).*

Chapter 5. Impact of miR-210 Deletion on the Transcriptome in HEK293T Cells

To evaluate the role of the miR-210 locus in a human genomic context, an experimental model was developed based on HEK293T cells, in which two types of knockout clones were generated: clones with deletion of the pre-miR-210 sequence and clones with extended deletion of the MIR210HG locus. Molecular validation confirmed the absence of miR-210 expression and MIR210HG host transcript in hypoxia. Transcriptomic analysis by RNA-seq revealed consistent changes in gene expression in knockout cells, affecting especially pathways involved in adaptation to hypoxia, cell cycle regulation, mTORC1 signaling, response to cellular stress, NF-κB activation, and response to proteotoxic stress. These results show that deletion of the miR-210 locus perturbs cellular adaptation programs to hypoxia and affects mechanisms of proliferation control.

A notable result of this chapter was the demonstration of the existence of a local, cis-type effect on the expression of genes located in the vicinity of the MIR210HG locus. Genes localized within an interval of approximately 400–500 kb around the locus showed expression changes, and analysis of chromatin interactions, using publicly available Hi-C data, suggested integration of the region into a topologically associated domain (TAD). These data support the hypothesis that deletion of the miR-210 locus can alter local chromatin architecture and cis-regulatory interactions in the region. Functional tests showed that deletion of the miR-210 locus reduces proliferative capacity and affects mitochondrial respiration, and cell cycle analysis indicated a delay in G1/S transition in hypoxia.

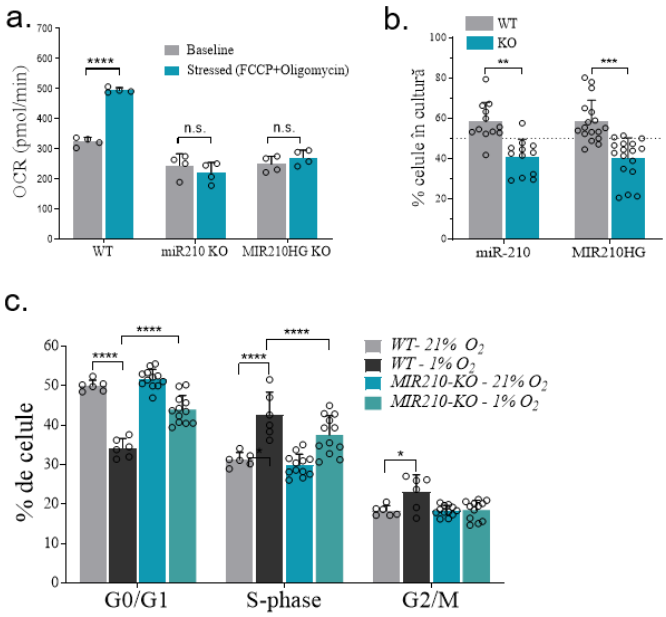


Figure 4. *Functional consequences of miR-210 locus deletion in HEK293T cells. (a) Changes in OCR in HEK clones, measured under basal and stress conditions. (b) Competitive proliferation tests between WT clones marked with GFP and miR210-KO or MIR210HG-KO marked with dTomato, analyzed after 3 days of co-culture. (c) Analysis of cell cycle distribution in HEK cells cultured under normoxic and hypoxic conditions. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA test, and statistical significance is represented as follows: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 (Figure adapted from Preda, M.B., 2025).*

Overall, these results demonstrate that the phenotype associated with miR-210 locus deletion cannot be explained exclusively by the loss of mature miR-210, but also reflects perturbation of an integrated genomic unit, which includes the MIR210HG host transcript and local regulatory elements.

V. General Conclusions

The results of this thesis demonstrate that miR-210 functions as an integrative regulator at the interface between hypoxia and inflammation. In both fibroblasts and human HEK293T cells, deletion of miR-210/its locus results in a common dysregulation of cellular adaptation to hypoxia: disruption of metabolic programs and mitochondrial function (reduction in respiratory capacity), alteration of cell cycle progression at the G1/S transition, and affecting transcriptional programs of hypoxia response. Furthermore, in both models deletion produces a local, cis-type effect: genes neighboring the locus are modified (Rassf7, Rnh1, Taldo1, Cd151), integrated within a topologically associated domain (TAD) — which shows that the miR-210/MIR210HG locus behaves as an integrated genomic unit, with the phenotype of deletion not being explainable exclusively by the loss of the mature microRNA. In macrophages, miR-210 maintains the balance between inflammatory activation and reparatory polarization: its absence results in a pro-inflammatory basal phenotype (IL-6, TNF-α, IL-1β) and incomplete M2 reprogramming, accompanied by activation of cellular stress programs (p53, TGF-β, MMP-9), positioning miR-210 as an integrative regulator of metabolism and inflammatory response. Overall, the functional consequences of miR-210 loss reflect both the absence of the mature miR and perturbation of local chromatin architecture.

VI. Original Contributions of the Thesis

1. Characterization and molecular validation of two complementary transgenic mouse models for functional study of miR-210 - constitutive deletion (KO) and inducible Tet-On/ROSA26 overexpression (OE), through genotyping and RT-qPCR in tissues and derived primary cells.

2. Demonstration of dose-dependent induction of miR-210 in vivo in the OE model and of the transient nature of overexpression in culture.

3. Identification, in fibroblasts with miR-210 deletion, of a transcriptomic signature of metabolic dysregulation (oxidative phosphorylation, glycolysis, fatty acid metabolism, mTORC1 signaling, and response to hypoxia).

4. Demonstration of reduction in maximal respiratory capacity and mitochondrial respiratory reserve, accompanied by increased mitochondrial ROS in hypoxia, in miR-210 KO fibroblasts.

5. Demonstration of cell cycle perturbation in KO fibroblasts (accumulation in S phase, reduction of G0/G1 fraction, and dysregulation of G1/S transition), with diminished proliferation rate.

6. Identification of a local effect of deletion on genes neighboring the miR-210 locus (Rassf7, Rnh1, Taldo1, Cd151), indicating perturbation of transcriptional regulation within the genomic domain containing it.

7. Demonstration of an accentuated pro-inflammatory basal phenotype in miR-210 KO M0 macrophages (increased secretion of IL-6, TNF-α, and IL-1β and accumulation of pro-IL-1β precursor).

8. Demonstration of deficient reprogramming toward the M2 phenotype in KO macrophages (reduction of M2 markers, increased susceptibility to apoptosis following TNF-α, and increased p53, TGF-β, and MMP-9).

9. Demonstration of reduced basal glycolytic activity and increased phagocytic and efferocytic capacity in miR-210 KO macrophages, positioning miR-210 as an integrative regulator of metabolism and inflammation.

10. Development of a human cell model (HEK293T) with deletion of either the pre-miR-210 sequence or the entire MIR210HG locus, through genome editing.

11. Demonstration, by RNA-seq, of perturbation of adaptation programs to hypoxia, cell cycle regulation, mTORC1 and NF-κB signaling, and response to proteotoxic stress in HEK293T KO clones.

12. Identification of a cis effect on expression of genes located at ~400–500 kb from the locus and, through integration of Hi-C data, placement of the region within a topologically associated domain (TAD), supporting the concept that the miR-210/MIR210HG locus functions as an integrated genomic unit.

VII. Selective Bibliography

1. Bakleh, M. Z., & Al Haj Zen, A. (2025). The distinct role of HIF-1α and HIF-2α in hypoxia and angiogenesis. Cells, 14.
2. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 116, 281–297.
3. Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell, 136, 215–233.
4. Bernardo, M. E., & Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: Sensors and switchers of inflammation. Cell Stem Cell, 13, 392–402.
5. Bruick, R. K., & McKnight, S. L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. Science, 294, 1337–1340.
6. Chan, S. Y., Zhang, Y. Y., Hemann, C., et al. (2009). MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing ISCU1/2. Cell Metabolism, 10, 273–284.
7. Chan, Y. C., Banerjee, J., Choi, S. Y., et al. (2012). miR-210: The master hypoxamir. Microcirculation, 19, 215–223.
8. Colgan, S. P., Furuta, G. T., & Taylor, C. T. (2020). Hypoxia and innate immunity. Annual Review of Immunology, 38, 341–363.
9. Davidson, S., Coles, M., Thomas, T., et al. (2021). Fibroblasts as immune regulators in infection, inflammation and cancer. Nature Reviews Immunology, 21, 704–717.

10. Devlin, C., Greco, S., Martelli, F., et al. (2011). miR-210: More than a silent player in hypoxia. IUBMB Life, 63, 94–100.
11. Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., et al. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. Nature, 485, 376.
12. Eltzschig, H. K., & Carmeliet, P. (2011). Hypoxia and inflammation. New England Journal of Medicine, 364, 656.
13. Engreitz, J. M., Haines, J. E., Perez, E. M., et al. (2016). Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. Nature, 539, 452–455.
14. Epstein, A. C. R., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., et al. (2001). EGL-9 and homologs regulate HIF by prolyl hydroxylation. Cell, 107, 43–54.
15. Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. Nature Reviews Genetics, 12, 861–874.
16. He, J., Wu, J., Xu, N., et al. (2012). MiR-210 disturbs mitotic progression. Nucleic Acids Research, 41, 498.
17. He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role. Nature Reviews Genetics, 5, 522–531.
18. Neculachi, C. A., Nastase-Rusu, E. G., Cherry, L., et al. (2025). miR-210 promotes the anti-inflammatory phenotype and M2 polarization in murine macrophages. Frontiers in Immunology, 16.
19. Nora, E. P., Lajoie, B. R., Schulz, E. G., et al. (2012). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. Nature, 485, 381–385.
20. Preda, M. B., Nastase-Rusu, E. G., Neculachi, C. A., et al. (2025). miR-210 locus deletion disrupts cellular homeostasis: an integrated genetic study. Scientific Reports, 15, 22659.
21. Semenza, G. L. (2012). Hypoxia inducible factors in physiology and medicine. Cell, 148, 399–408.
22. Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L., et al. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 22, 96–118.

VIII. Efficiency and Dissemination of Research

Papers Published in ISI-Indexed Journals as First Author

1. Neculachi CA, Nastase-Rusu EG, Cherry L, Marinescu-Colan CI, Tastsoglou S, Cosman BP, Popa AM, Panciuc C, Zaccagnini G, Catrina SB, Simionescu M, Martelli F, Preda MB, Burlacu A. miR-210 promotes the anti-inflammatory phenotype and M2 polarization in murine macrophages. Front Immunol. 2025;16:1633163. doi: 10.3389/fimmu.2025.1633163. IF 2024: 5.9 (Q1).

Papers Published in International Database-Indexed Journals as First Author

1. Neculachi CA*, Leti LI*, Burlacu A, Preda MB. Inflammation and Hypoxia Negatively Impact the Survival and Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stromal Cells In Vitro. Rom J Cardiol. 2021;31(3):547–554. doi: 10.47803/rjc.2021.31.3.547. (*contribuții egale).

Papers Published in ISI-Indexed Journals as Co-author

1. Cherry L, Popescu S, Neculachi CA, Nastase-Rusu EG, Marinescu-Colan CI, Cosman BP, Ciortan L, Martelli F, Simionescu M, Butoi E, Burlacu A, Preda MB. Mesenchymal stromal cells modulate neutrophil phenotype via paracrine signals. Stem Cell Res Ther. 2025;16(1):574. doi: 10.1186/s13287-025-04684-w. IF 2024: 7.3 (Q1).

2. Preda MB, Nastase-Rusu EG, Neculachi CA, Zhong X, Voellenkle C, Mazure NM, Balacescu O, Ivan C, Zheng XW, Gherghiceanu M, Lebrigand K, Simionescu M, Martelli F, Mari B, Catrina SB, Burlacu A, Ivan M. miR-210 locus deletion disrupts cellular homeostasis: an integrated genetic study. Sci Rep. 2025;15(1):22659. doi: 10.1038/s41598-025-07572-8. IF 2024: 3.9 (Q1).

3. Marinescu-Colan CI, Nastase-Rusu EG, Neculachi CA, Martelli F, Cherry L, Preda MB, Burlacu A. From cancer to heart fibrosis – GLIPR1 highlights a subset of myofibroblasts responsive to mesenchymal stem cell therapy after myocardial infarction. Biomed Pharmacother. 2025;187:118087. doi: 10.1016/j.biopha.2025.118087. IF 2024: 7.5 (Q1).

4. Rusu-Nastase EG, Lupan AM, Marinescu CI, Neculachi CA, Preda MB, Burlacu A. MiR-29a increase in aging may function as a compensatory mechanism against cardiac fibrosis through SERPINH1 downregulation. Front Cardiovasc Med. 2022;8:810241. doi: 10.3389/fcvm.2021.810241. IF 2022: 3.6 (Q2).

5. Preda MB, Neculachi CA, Fenyo IM, Vacaru AM, Publik MA, Simionescu M, Burlacu A. Short lifespan of syngeneic transplanted MSC is a consequence of in vivo apoptosis and immune cell recruitment in mice. Cell Death Dis. 2021;12(6):566. doi: 10.1038/s41419-021-03839-w. IF 2022: 8.5 (Q1).

6. Marinescu CI, Preda MB, Neculachi CA, Rusu EG, Popescu S, Burlacu A. Identification of a hematopoietic cell population emerging from mouse bone marrow with proliferative potential in vitro and immunomodulatory capacity. Front Immunol. 2021;12:698070. doi: 10.3389/fimmu.2021.698070. IF 2021: 7.6 (Q1).

7. Preda MB, Lupan AM, Neculachi CA, Leti LI, Fenyo IM, Popescu S, Rusu EG, Marinescu CI, Simionescu M, Burlacu A. Evidence of mesenchymal stromal cell adaptation to local microenvironment following subcutaneous transplantation. J Cell Mol Med. 2020;24(18):10889–10897. doi: 10.1111/jcmm.15717. IF 2020: 5.3 (Q2).

Posters Presented at International Scientific Events

1. Neculachi CA, Nastase-Rusu EG, Zaccagnini G, Martelli F, Burlacu A, Preda MB. The role of hypoxamir-210 on macrophage behaviour. Poster presentation, International Conference and XXXIX Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology, Cluj-Napoca, Romania, October 21–23, 2022.

2. Neculachi CA, Nastase-Rusu EG, Marinescu-Colan CI, Preda MB, Burlacu A. MiR-210 deficiency enhances pro-inflammatory activation and disrupts M2 macrophage differentiation in murine models. Poster presentation, 42nd Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology, Bucharest, Romania, November 20–21, 2025.

3. Neculachi CA, Nastase-Rusu EG, Cherry L, Marinescu-Colan CI, Tastsoglou S, Cosman BP, Simionescu M, Martelli F, Preda MB, Burlacu A. MiR-210 is required for complete

polarisation of M2 macrophages. Poster presentation, CBFH Biennial Meeting – ESC Working Groups on Cellular Biology of the Heart and Myocardial Function, Naples, Italy, November 26–28, 2025.1.

Oral presentations at international scientific conferences

1. Neculachi CA. Oral presentation, 9th COST Action CardioRNA MC and WG Meeting, "miR-210 at the overlap between hypoxia signalling and inflammatory pathways in macrophage biology", University of Nicosia, Nicosia, Cyprus, February 22–24, 2023.

International Scholarships

1. Neculachi CA. Research Mobility Scholarship – Short-Term Scientific Mission (STSM) awarded within the COST Action CA17129 – CardioRNA: Functional Significance of the Non-Coding Genome in the Cardiovascular System. Project title: miR-210 at the overlap between hypoxia signalling and inflammatory pathways in macrophage biology. Host institution: IRCCS Policlinico San Donato, Milano, Italy (coordinator: Prof. Fabio Martelli). Period: June 15, 2022 – August 31, 2022 (3 months)

Research Funding and Research Project Collaborations

1. Doctoral Scholarship – Romanian Academy (SCOSAAR), 2020–2023 (Contract No. 60/02.11.2020).

2. Collaborator – Project PNRR-III-C9-2022-I8-186: "Targeting Cardiac Fibrosis in Heart Failure: Challenges and Potential Solutions Based on ncRNA Therapeutics" (FibroThera). Project Director: Dr. Fabio Martelli (Scientific Director, Molecular Cardiology Laboratory, I.R.C.C.S. Policlinico San Donato, Italy). Period: 2023–2026.

3. Collaborator – Project PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0172: "Targeting Innate Immune Mechanisms to Improve Risk Stratification and to Identify Future Therapeutic Options in Myocardial Infarction" (INNATE-MI). Project Director: Acad. Maya Simionescu. Period: 2020–2022.

4. Collaborator – Project PN-III-P1-1.1-TE-2019-1893: "MiR-210 Genomic Locus at the Overlap Between Hypoxia Signalling and Inflammatory Networks" (210-HINT). Project Director: Dr. Bogdan Preda. Period: 2021–2022.

ACADEMIA ROMÂNĂ
Şcoala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Strategii nanoterapeutice inovatoare pentru țintirea inflamației vasculare în ateroscleroză.

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
Acad. ILEANA MÂNDUȚEANU

DOCTORAND:
MARIA FLORENTINA ANGHELACHE

2025

CUPRINS

LISTĂ ABREVIERI **6**

I. INTRODUCERE **8**

II. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII **13**

II.1. Sistemul Cardiovascular: Organizare și Funcționalitate *14*

II.1.1. Componentele sistemului cardiovascular 14

II.1.1.1. Inima 14

II.1.1.2. Vasele de sânge 14

II.2. Inflamația în Ateroscleroză *17*

II.2.1. Inflamația acută 18

II.2.2. Inflamația cronică 18

II.2.3. Mecanisme ale inflamației 19

II.2.4. Etapele formării plăcii aterosclerotice 21

II.2.4.1. Activarea celulelor endoteliale 21

II.2.4.2. Disfuncția endotelială și acumularea LDL 23

II.2.4.3. Amplificarea procesului inflamator 24

II.2.4.4. Formarea și stabilizarea plăcii aterosclerotice 26

II.2.4.5. Dezvoltarea miezului necrotic și ruptura plăcii aterosclerotice 27

II.3. Rezoluția Inflamației în Ateroscleroză *29*

II.3.1. Mediatorii specializați pro-rezoluție (SPM) 32

II.3.1.1. Biosinteza SPM și indicii de rezoluție 33

II.3.1.2. Principalele clase de SPM și rolul lor fiziologic 34

II.3.1.3. Interacțiunea SPM cu receptorii GPCR 40

II.3.2. Rolul macrofagelor în rezoluția inflamației plăcii aterosclerotice 45

II.4. Abordări Curente în Tratamentul Aterosclerozei *48*

II.4.1. Abordare non-farmacologică 48

II.4.2. Terapii de reducere a lipidelor 48

II.4.3. Terapii anti-trombotice 50

II.4.4. Terapii anti-inflamatoare 50

II.5. Nanotehnologia în Terapia Aterosclerozei *53*

II.5.1. Tipuri de nanoparticule 53

II.5.1.1. Nanoparticule anorganice 53

II.5.1.2. Nanoparticule organice 55

II.5.2. Strategii de țintire a peretelui vascular 58
II.5.2.1. Țintire pasivă 59
II.5.2.2. Țintire activă 59
II.6. Nanoterapia Aterosclerozei prin Promovarea Rezoluției Inflamației 67
II.6.1. Agenți Farmacologici pentru Rezoluția Inflamației 67
II.6.1.1. Molecule sintetice și analogi ai SPM 67
II.6.1.2. Agenți care modulează indirect căile pro-rezoluție 68
II.6.2. Nanoplatforme pentru Livrarea Mediatorilor Specializați Pro-Rezoluție sau Analogilor Acestora 69
II.6.3. Studii Clinice 72
III. CONTRIBUȚII ORIGINALE 73
A. CARACTERIZAREA ȘI TESTAREA UNUI SISTEM DE NANOPARTICULE MAGNETICE ACOPERITE CU DEXTRAN ÎNCĂRCATE CU ACID PROTOCATEHUIC ÎN TERAPIA INFLAMAȚIEI VASCULARE 74
III.A.1. Caracterizarea și evaluarea in vitro a nanoparticulelor magnetice acoperite cu dextran și încărcate cu acid protocatehuic 74
III.A.1.1. Introducere și obiective 74
III.A.1.2. Protocoale experimentale și metode de analiză 76
III.A.1.2.1. Reactivi 76
III.A.1.2.2. Sinteza nanoparticulelor magnetice (MNP) 76
III.A.1.2.3. Sinteza MNP acoperite cu dextran (MNP-Dex) 77
III.A.1.2.4. Sinteza MNP acoperite cu dextran încărcate cu PCA (MNP-Dex/PCA) 77
III.A.1.2.5. Încărcarea PCA pe MNP-Dex 77
III.A.1.2.6. Analiza morfologică a MNP-Dex/PCA 78
III.A.1.2.7. Dimensiunea și Potențialul Zeta 78
III.A.1.2.8. Modelul celular *in vitro* 78
III.A.1.2.9. Teste de citotoxicitate celulară 79
III.A.1.2.10. Internalizarea nanoparticulelor magnetice 80
III.A.1.2.11. Testul de adeziune al monocitelor 80
III.A.1.3. Rezultate 83
III.A.1.3.1. Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor magnetice încărcate cu PCA 83
III.A.1.3.2. Evaluarea *in vitro* a citotoxicității nanoparticulelor magnetice încărcate cu PCA 86
III.A.1.3.3. Localizarea intracelulară a MNP-Dex/PCA 88

III.A.1.3.4. Efectul anti-inflamator al MNP-Dex/PCA 89
III.A.1.4. Discuții și concluzii parțiale 96
B. DEZVOLTAREA UNUI SISTEM DE LIVRARE DE MEDICAMENTE BAZAT PE O STRATEGIE BIOMIMETICĂ PENTRU PROMOVAREA PROCESULUI DE REZOLUȚIE A INFLAMAȚIEI ÎN ATEROSCLEROZĂ 100
III.B.1. Sinteza şi caracterizarea nanocărăuşilor încărcaţi cu mediatori pro-rezoluţie pentru tratamentul aterosclerozei 100
III.B.1.1. Introducere și obiective 100
III.B.1.2. Protocoale experimentale și metode de analiză 102
III.B.1.2.1. Reactivi 102
III.B.1.2.2. Culturi celulare 102
III.B.1.2.3. Izolarea membranelor macrofagelor 103
III.B.1.2.4. Prepararea nanoemulsiilor lipidice (LN) încărcate cu SPM (LN/SPM) 103
III.B.1.2.5. Prepararea nanoemulsiilor lipidice biomimetice încărcate cu SPM (Bio-LN/SPM) 104
III.B.1.2.6. Determinarea dimensiunii și a potențialului Zeta 104
III.B.1.2.7. Microscopie electronică de transmisie cu colorație negativă (TEM) 105
III.B.1.2.8. Determinarea încorporării SPM în nanoemulsii 105
III.B.1.2.9. Detectarea proteinelor membranare ale macrofagelor în Bio-LN/SPM prin imunoblotting 106
III.B.1.3. Rezultate 108
III.B.1.3.1. Strategia de sinteză a nanoparticulelor biomimetice (Bio-LN/SPM) 108
III.B.1.3.2. Bio-LN/SPM prezintă în compoziția lor proteine membranare provenite de la macrofage 110
III.B.1.3.3. Bio-LN/SPM reprezintă o platformă eficientă pentru menținerea stabilității SPM 111
III.B.1.3.4. Bio-LN/SPM prezintă stabilitate ridicată pe termen lung 113
III.B.1.4. Discuții și concluzii parțiale 114
III.B.2. Utilizarea nanocărăuşilor pentru transportul mediatorilor pro-rezoluţie in vitro, la nivelul celulelor vasculare şi imune implicate in evoluţia ateromului. 116
III.B.2.1. Introducere și obiective 116
III.B.2.2. Protocoale experimentale și metode de analiză 117
III.B.2.2.1. Sinteza nanoparticulelor biomimetice (Bio-LN/SPM) 117

III.B.2.2.2. Modelul celular *in vitro* ... 117
III.B.2.3. Rezultate ... 123
III.B.2.3.1. Viabilitatea celulară și internalizarea Bio-LN/SPM de către celule endoteliale, celule musculare netede și macrofage ... 123
III.B.2.3.2. Legarea Bio-LN/SPM la suprafața celulelor endoteliale, celulelor musculare netede și macrofagelor; rolul receptorilor SPM ... 126
III.B.2.3.3. Bio-LN/SPM au un rol funcțional în inhibarea adeziunii monocitelor și transmigrării acestora către/prin celulele endoteliale activate ... 130
III.B.2.3.4. Expunerea la Bio-LN/SPM crește activitatea fagocitară a macrofagelor ... 132
III.B.2.3.5. Expunerea la Bio-LN/SPM reduce expresia proteinelor asociate cu procesul inflamator în celulele endoteliale, celulele musculare netede și macrofage ... 133
III.B.2.4. Discuții și concluzii parțiale ... 135
III.B.3. Utilizarea nanocăruşilor pentru transportul direcționat al mediatorilor pro-rezoluție la nivelul plăcilor aterosclerotice în modelul murin ApoE$^{-/-}$ în scopul rezoluției inflamației ... 138
III.B.3.1. Introducere și Obiective ... 138
III.B.3.2. Protocoale experimentale și metode de analiză ... 140
III.B.3.2.1. Modelul animal de ateroscleroză ... 140
III.B.3.2.2. Testul de hemocompatibilitate ... 140
III.B.3.2.3. Evaluarea funcției hepatice și renale ... 141
III.B.3.2.4. Mouse cytokine array ... 141
III.B.3.2.5. Evaluarea celulelor imune ... 142
III.B.3.2.6. Imagistica *ex vivo* a biodistribuției nanoparticulelor biomimetice ... 142
III.B.3.2.7. Colorația Oil Red O (ORO) ... 143
III.B.3.2.8. Analiza statistică ... 143
III.B.3.3. Rezultate ... 144
III.B.3.3.1. Bio-LN/SPM pot fi administrate *in vivo* fără a induce efecte secundare acute ... 144
III.B.3.3.2. Bio-LN/SPM se acumulează în leziunile aterosclerotice ale șoarecilor ApoE$^{-/-}$ ... 148
III.B.3.4. Discuții și concluzii parțiale ... 151
III.B.4. Evaluarea efectului terapeutic al nanocăruşilor biomimetici încărcați cu mediatori pro-rezoluție asupra dezvoltării plăcii aterosclerotice ... 154
III.B.4.1. Introducere și obiective ... 154
III.B.4.2. Protocoale experimentale și metode de analiză ... 157

III.B.4.2.1. Sinteza și caracterizarea nanoemulsiilor lipidice biomimetice încărcate cu SPMs (Bio-LN/SPMs) 157
III.B.4.2.2. Model animal de ateroscleroză și strategie de tratament 158
III.B.4.2.3. Prelevarea și procesarea țesuturilor 159
III.B.4.2.4. Investigații plasmatice 159
III.B.4.2.5. Investigații prin citometrie în flux 160
III.B.4.2.6. Investigații asupra aortei 161
III.B.4.2.7. Analiza statistică 166
III.B.4.3. Rezultate 167
III.B.4.3.1. Prepararea și caracterizarea Bio-LN/SPM 167
III.B.4.3.2. Administrarea in vivo a Bio-LN/SPMs îmbunătățește metabolismul lipidic și funcția renală și nu prezintă toxicitate hepatică detectabilă 168
III.B.4.3.3. Bio-LN/SPMs reduc producția de proteine plasmatice asociate cu activarea complementului și inflamației 170
III.B.4.3.4. Bio-LN/SPMs induc un profil anti-inflamator în monocitele circulatorii 171
III.B.4.3.5. Bio-LN/SPMs promovează rezoluția inflamației prin reducerea expresiei MCP-1 și a monocitelor infiltrate în arterele șoarecilor 174
III.B.4.3.6. Bio-LN/SPMs facilitează rezoluția inflamației prin exercitarea unui efect anti-inflamator în aorta șoarecilor ApoE$^{-/-}$ 176
III.B.4.3.7. Bio-LN/SPM promovează rezoluția inflamației în placa aterosclerotică prin polarizarea macrofagelor către un fenotip reparator de tip M2 177
III.B.4.3.8. Tratamentul cu Bio-LN/SPM atenuează inflamația și stimulează rezoluția acesteia în leziunile de la nivelul rădăcinii aortice. 179
III.B.4.3.9. Tratamentul cu Bio-LN/SPM reduce depozitele de lipide în plăcile aterosclerotice ale șoarecilor ApoE$^{-/-}$ 181
III.B.4.4. Discuții și concluzii parțiale 183
IV. CONCLUZII GENERALE 189
V. BIBLIOGRAFIE 192

REZUMAT

Cuvinte cheie: ateroscleroză, inflamație vasculară, rezoluția inflamației, mediatori specializați pro-rezoluție, nanoterapie, nanoparticule biomimetice, celule endoteliale, celule musculare netede vasculare, macrofage.

Număr total de pagini – 237

Număr de figuri în Partea I – 12

Număr de tabele în Partea I – 1

Număr de figuri în Partea II – 41

Număr de tabele în Partea II –8

Referințe bibliografice – 400

Lucrări publicate în reviste indexate ISI în perioada stagiului de doctorat – 12 (5 autor principal)

Rezumate publicate în reviste indexate ISI – 4 (1 autor principal)

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale – 5 (autor principal)

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – 3 (autor principal)

Brevete – 1

Burse obținute pe durata programului doctoral – 2

Specializări și cursuri efectuate – 3

Premii – 3

Participarea în proiecte de cercetare – 5

A. Introducere și obiective

Bolile cardiovasculare (BCV) reprezintă principala cauză de mortalitate în România, responsabile pentru peste 55% dintre decesele anuale (Institutul Național de Sănătate Publică, 2024). În acest context, ateroscleroza (AS), o afecțiune cronică inflamatoare a peretelui vascular, joacă un rol central în dezvoltarea complicațiilor cardiovasculare acute, precum infarctul miocardic sau accidentul vascular cerebral. Deși terapiile convenționale, cum ar fi statinele și agenții antitrombotici, reduc incidența evenimentelor cardiovasculare, acestea nu reușesc să abordeze eficient inflamația vasculară persistentă, o componentă esențială a progresiei plăcii aterosclerotice (d'Aiello et al., 2024).

În mod particular, s-a demonstrat că eșecul rezoluției inflamației, proces fiziologic activ și coordonat, contribuie semnificativ la instabilitatea plăcilor și progresia bolii (Fredman, 2019). În acest context, mediatori specializați pro-rezoluție (SPM) precum resolvinele sau lipoxinele, reprezintă o clasă emergentă de molecule capabile să restabilească homeostazia vasculară prin inducerea activă a rezoluției inflamației. Cu toate acestea, utilizarea terapeutică a SPM este limitată de stabilitatea lor redusă în circulație și de biodisponibilitatea scăzută la locul leziunii aterosclerotice (Fredman & Serhan, 2024).

În paralel, compuși naturali precum acidul protocatehuic (PCA), cu rol anti-inflamator și antioxidant, au fost propuși ca adjuvanți în combaterea inflamației endoteliale și macrofagice. Totuși, eficacitatea lor terapeutică este limitată de biodisponibilitatea redusă și țintirea nespecifică (Cory et al., 2018). Nanotehnologia oferă o soluție inovatoare pentru aceste provocări, facilitând livrarea țintită și protejarea compușilor de interes în forme farmaceutice stabile (Ahmad et al., 2022).

Pornind de la aceste premise, **scopul principal al acestei teze de doctorat** a fost dezvoltarea și caracterizarea unor **platforme nanoterapeutice inovatoare** pentru combaterea inflamației vasculare în AS, având ca mecanisme complementare: (1) inducerea activă a rezoluției inflamației prin livrarea de SPM sau (2) inhibarea căilor inflamatoare pro-aterogene prin livrarea de PCA.

Au fost propuse și realizate următoarele **obiective specifice**:

1. Caracterizarea și testarea unor nanoparticule magnetice acoperite cu dextran și încărcate cu acid protocatehuic (MNP-Dex/PCA), cu scopul de a inhiba inflamația

vasculară prin reducerea expresiei citokinelor pro-inflamatoare și a adeziunii monocitelor la celulele endoteliale (CE) activate, în modele celulare *in vitro*.

2. Dezvoltarea și caracterizarea unor nanoparticule biomimetice încărcate cu SPM (Bio-LN/SPM) și testarea efectului acestora *in vitro* asupra fenotipului inflamator al CE, macrofagelor (Mφ) și celulelor musculare netede (CMN) implicate în patogeneza AS.
3. Evaluarea biodistribuției și a efectelor acute ale nanoparticulelor Bio-LN/SPM în modelul murin de AS (șoareci ApoE $^{-/-}$ hiperlipidemici), prin analizarea acumulării la nivelul aortei, a modificărilor în compoziția celulelor imune circulante și a profilului de citokine inflamatoare, la 24 de ore de la administrare.
4. Validarea eficacității preclinice a strategiei nanoterapeutice pro-rezolutive în AS, în modelul murin ApoE $^{-/-}$, prin demonstrarea efectului terapeutic al nanoparticulelor Bio-LN/SPM asupra leziunilor aterosclerotice aflate în două stadii de progresie a plăcii, cu accent pe reducerea inflamației vasculare și acumulării lipidice în aortă și rădăcina aortică.

B. Structura tezei

Teza de doctorat este structurată în două părți majore:

Partea I – Stadiul actual al cunoașterii cuprinde o analiză a literaturii de specialitate privind rolul inflamației în ateroscleroză (AS), mecanismele moleculare implicate în rezoluția acesteia și strategiile nanoterapeutice emergente, care pot influența pozitiv cursul bolii. Această parte este alcătuită din șase capitole, care oferă o bază teoretică solidă pentru dezvoltarea celor două direcții experimentale.

În ***capitolul 1*** este prezentată organizarea structurală și funcțională a sistemului cardiovascular, cu accent pe arhitectura peretelui arterial și pe rolul critic al celulelor endoteliale în menținerea homeostaziei vasculare. Sunt discutate dezechilibrele care pot perturba funcția endotelială și care contribuie la declanșarea patologiilor vasculare, precum AS.

Capitolul 2, „Inflamația în Ateroscleroză”, detaliază în mod sistematic etapele progresiei leziunilor aterosclerotice, pornind de la activarea endotelială și acumularea

LDL în spațiul subendotelial, până la formarea celulelor spumoase, a miezului necrotic și ruperea plăcii. Sunt evidențiate procesele inflamatoare care amplifică vulnerabilitatea plăcii și sunt discutate elementele celulare implicate.

Capitolul 3 este dedicat conceptului de „Rezoluție a inflamației" ca proces activ și cu mecanisme de reglare complexe, diferit de inhibarea clasică a inflamației. Este prezentat un cadru conceptual complet privind mediatorii specializați pro-rezoluție (SPM), precum lipoxinele, resolvinele, maresinele și protectinele, accentuând rolul lor în restabilirea homeostaziei tisulare. O sinteză extinsă a claselor, funcțiilor, mecanismelor de acțiune și receptorilor acestor mediatori a fost detaliată în cadrul acestui capitol, constituind baza teoretică pentru strategiile farmacologice pro-rezolutive propuse ulterior în partea experimentală a tezei.

Capitolul 4 evidențiază limitările terapiilor convenționale actuale, care vizează în principal scăderea nivelului lipidelor sau suprimarea răspunsului inflamator. Se argumentează că aceste strategii nu reușesc să prevină progresia leziunilor aterosclerotice și nu abordează cauza persistenței inflamației. Astfel, este justificată necesitatea unor intervenții terapeutice inovatoare, capabile nu doar să inhibe inflamația, ci și să activeze mecanismele fiziologice de rezoluție, promovând restaurarea homeostaziei vasculare.

Capitolul 5 introduce domeniul nanomedicinei, cu accent pe nanoterapia aplicată în bolile cardiovasculare. Sunt detaliate tipurile de nanoparticule utilizate în acest context, punându-se accent pe avantajele livrării direcționate și pe strategiile de funcționalizare menite să crească eficiența terapeutică. De asemenea, este prezentat conceptul de nanoparticule biomimetice, cu evidențierea potențialului acestora de a imita componente celulare naturale pentru a facilita recunoașterea specifică a țesuturilor inflamate și a îmbunătăți distribuția țintită a agenților terapeutici.

Capitolul 6 explorează aplicațiile directe ale SPM și ale analogilor lor sintetici în inflamația cronică și în AS. Sunt descrise studii preclinice și potențiale direcții de cercetare în care SPM sunt considerați terapii promițătoare, cu mecanisme complementare față de medicamentele anti-inflamatoare tradiționale.

Partea a II-a – Contribuții originale este dedicată studiilor experimentale realizate, împărțite în două direcții nanoterapeutice distincte:

Capitolul 1 descrie dezvoltarea, caracterizarea și evaluarea *in vitro* a nanoparticulelor magnetice acoperite cu dextran și încărcate cu acid protocatehuic (MNP-Dex/PCA). Studiul demonstrează eficiența acestor nanoparticule în reducerea expresiei citokinelor pro-inflamatoare în celulele endoteliale și în macrofagele de tip M1. De asemenea, MNP-Dex/PCA inhibă căile de semnalizare NF-κB și MAPK și reduc adeziunea monocitelor la endoteliul activat, susținând potențialul acestora în terapia inflamației vasculare.

Capitolul 2 este dedicat unui studiu amplu ce cuprinde secțiuni experimentale care vizează promovarea activă a rezoluției inflamației prin utilizarea de nanoparticule biomimetice încărcate cu mediatori specializați pro-rezoluție (Bio-LN/SPM).

- Secțiunea 1 prezintă procesul de sinteză și caracterizare fizico-chimică a nanoparticulelor biomimetice, inclusiv evaluarea compoziției, dimensiunii și potențialului zeta.
- Secțiunea 2 analizează efectele *in vitro* ale acestor nanoparticule asupra liniilor celulare relevante pentru AS (CE, Mϕ și SMC). S-a constatat o scădere semnificativă a expresiei markerilor inflamatori și promovarea unui fenotip anti-inflamator.
- Secțiunea 3 se concentrează pe testarea *in vivo* a Bio-LN/SPM în modelul murin $ApoE^{-/-}$, la 24 de ore post-injectare. Au fost evaluate distribuția nanoparticulelor și efectele acute asupra profilului imun.
- Secțiunea 4 investighează impactul terapeutic al Bio-LN/SPM asupra leziunilor aterosclerotice ale șoarecilor $ApoE^{-/-}$ aflate în două stadii diferite de progresie (4 săptămâni și 8 săptămâni de dietă bogată în grăsimi), evidențiind reducerea inflamației sistemice și locale și a acumulării de lipide, precum și inducerea unui fenotip pro-rezolutiv al macrofagelor de la nivelul plăcii aterosclerotice.

Astfel, structura tezei reflectă o abordare integrată și progresivă, de la înțelegerea detaliată a patologiei AS și a proceselor moleculare implicate în inflamație și rezoluție, până la dezvoltarea și validarea experimentală a unor soluții terapeutice inovatoare. Fiecare capitol contribuie logic și științific la consolidarea ipotezei de cercetare și la demonstrarea aplicabilității nanomedicinei în tratamentul personalizat al inflamației vasculare asociate AS.

C. Principalele rezultate și concluzii:

1. Obținerea nanoparticulelor magnetice MNP-Dex/PCA care pot fi folosite ca vehicule teranostice ce combină diagnosticul și terapia într-o singură platformă

- Au fost obținute nanoparticule stabile coloidal în care PCA a fost eficient adsorbit pe suprafața nanoparticulelor și menținut în formă activă.
- MNP-Dex/PCA au fost preluate eficient de celulele endoteliale și de macrofagele pro-inflamatoare M1, fără efecte citotoxice la concentrații < 100 μg/mL.
- Tratamentul cu MNP-Dex/PCA a determinat:
    - Inhibarea căilor de semnalizare inflamatorii NF-κB și MAPK cu reducerea expresiei IL-1β, TNF-α, IL-6, MCP-1, p38 și ERK1/2.
    - Diminuarea adeziunii monocitelor la endoteliul activat.

Aceste date confirmă potențialul acestor nanoparticule de a inhiba răspunsul inflamator vascular, deschizând posibilitatea utilizării lor în prevenția progresiei plăcii aterosclerotice.

2. Obținerea și validarea preclinică a nanoparticulelor biomimetice încărcate cu mediatori specializați pro-rezoluție într-un model murin de ateroscleroză

- S-au obținut nanoemulsii acoperite cu membrane celulare pentru a mima structura monocitelor circulante, având ca încărcătură activă SPM (Bio-LN/SPM).
- *In vitro,* Bio-LN/SPM:
    - Au redus expresia markerilor inflamatori (VCAM-1, MCP-1, NLRP3, IL-1β),
    - Au promovat un fenotip M2 pro-rezolutiv în macrofage (scăderea iNOS și creșterea capacității fagocitare),
    - Au diminuat adeziunea și transmigrarea monocitelor prin endoteliul activat.
- *In vivo* (șoareci $ApoE^{-/-}$ hrăniți cu dietă bogată în grăsimi):
    - Administrarea intravenoasă a Bio-LN/SPM a dus, după 24 de ore, la:
        - Reducerea monocitelor și neutrofilelor circulante,
        - Scăderea nivelurilor plasmatice de citokine (IFN-γ, CXCL10, IL-16, TIMP-1 și TNF-α) și chemokine (MCP-1 și C5a),
        - Acumulare selectivă la nivelul aortei.

- Administrarea repetată în două stadii diferite de progresie a plăcii aterosclerotice a demonstrat:
  - Scăderea inflamației sistemice și modularea populațiilor imune circulante,
  - Reducerea inflamației locale și inducerea unui fenotip pro-rezolutiv de tip M2 în macrofagele aortice, evidențiată prin creșterea expresiei markerilor CD206 și MerTK, concomitent cu scăderea nivelului iNOS,
  - Reducerea acumulării lipidice în leziuni.

Aceste rezultate confirmă faptul că Bio-LN/SPM nu doar inhibă inflamația, ci promovează rezoluția acesteia, reprogramând fenotipul imun și micromediul aortic.

D. Contribuțiile originale ale tezei

1. Dezvoltarea a două platforme nanoterapeutice cu mecanisme complementare, validate *in vitro* sau *in vivo*, pentru combaterea inflamației vasculare:

a) MNP-Dex/PCA – efect anti-inflamator prin inhibarea NF-κB și MAPK (Figura 1).

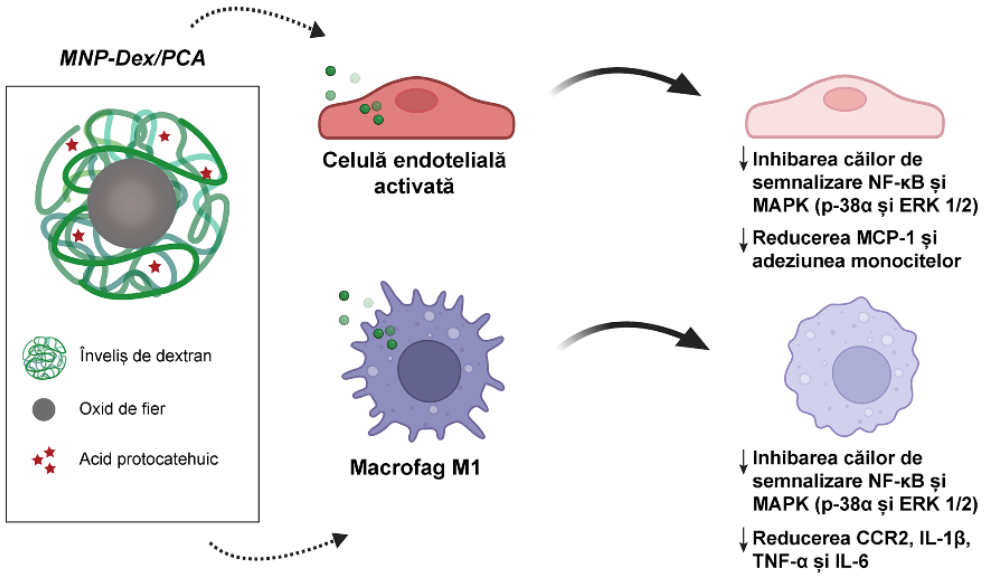


Figura 1. Strategia nanoterapeutică dezvoltată în cadrul primului studiu pentru combaterea inflamației vasculare asociate AS. Schema ilustrează mecanismul de acțiune al nanoparticulelor magnetice acoperite cu dextran și încărcate cu acid protocatehuic (MNP-Dex/PCA), care sunt internalizate de CE și MΦ de tip M1, determinând inhibarea căilor de semnalizare inflamatorii (NF-κB și MAPK p38α și ERK1/2) și limitarea adeziunii monocitelor.

b) Bio-LN/SPM – efect pro-rezolutiv, prin inducerea unui fenotip M2 în macrofage, scăderea merkerilor inflamatori și reducerea depozitelor lipidice în placa aterosclerotică (Figura 2).

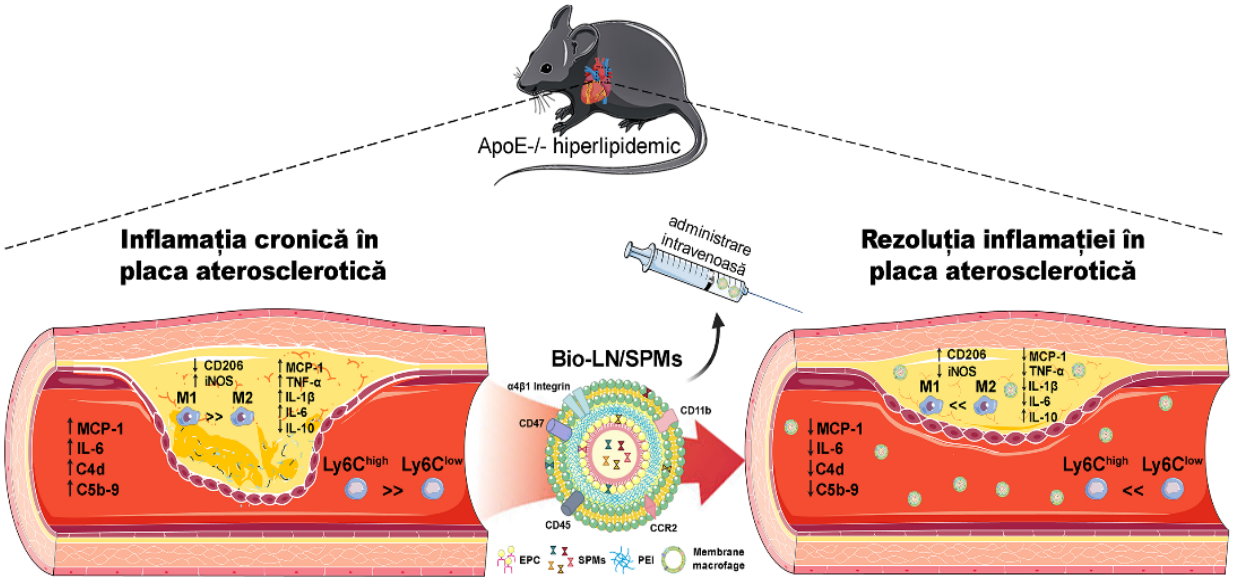


Figura 2. Reprezentare schematică a strategiei nanoterapeutice dezvoltate în cel de-al doilea studiu în vederea promovării rezoluției inflamației vasculare asociate AS. Este ilustrat efectul nanoparticulelor biomimetice încărcate cu mediatori specializați pro-rezoluție (Bio-LN/SPM) asupra CE, CMN vasculare și MΦ în modelul murin ApoE$^{-/-}$ hiperlipidemic. Tratamentul cu Bio-LN/SPM determină reducerea expresiei markerilor inflamatori circulanți și locali, inducerea unui fenotip reparator în MΦ și diminuarea acumulării lipidice în leziunile aterosclerotice.

2. Confirmarea rolului rezoluției inflamatorii în controlul AS și validarea SPM ca agenți terapeutici viabili în nanomedicina cardiovasculară.

E. Concluzii generale

Această teză aduce o contribuție semnificativă la înțelegerea și tratarea inflamației vasculare cronice în contextul AS, propunând două abordări nanoterapeutice complementare. În timp ce MNP-Dex/PCA inhibă căile inflamatorii pro-aterogene, Bio-LN/SPM promovează activ rezoluția inflamației, un proces esențial, dar ignorat până recent în tratamentele actuale. Prin aceste strategii, lucrarea demonstrează aplicabilitatea nanomedicinei în terapia cardiovasculară personalizată, deschizând noi direcții pentru intervenția precoce și țintită în AS.

F. Bibliografie

1. Ahmad, M. Z., Bhatnagar, D., Ladhe, S., Kumar, D., Pathak, K., Das, R. J., Sarma, H., & Mustafa, G. (2022). Liposomes and Niosomes for Targeted Drug and Gene Delivery Systems. In *Nanotechnology in the Life Sciences*. https://doi.org/10.1007/978-3-031-12658-1_12
2. Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 5). https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087
3. d'Aiello, A., Filomia, S., Brecciaroli, M., Sanna, T., Pedicino, D., & Liuzzo, G. (2024). Targeting Inflammatory Pathways in Atherosclerosis: Exploring New Opportunities for Treatment. *Current Atherosclerosis Reports*, *26*(12), 707–719. https://doi.org/10.1007/s11883-024-01241-3
4. Fredman, G. (2019). Can Inflammation-Resolution Provide Clues to Treat Patients According to Their Plaque Phenotype? *Frontiers in Pharmacology*, *10*(MAR). https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00205
5. Fredman, G., & Serhan, C. N. (2024). Specialized pro-resolving mediators in vascular inflammation and atherosclerotic cardiovascular disease. In *Nature Reviews Cardiology*. https://doi.org/10.1038/s41569-023-00984-x
6. Institutul Național de Sănătate Publică. (2024). *Analiză de situație privind problematica bolilor cardiovasculare*.

EFICIENȚA ȘI DISEMINAREA CERCETĂRILOR

Lucrări publicate în reviste internaţionale cotate ISI (12 lucrări)

Autor principal (5):

1. **Anghelache, M.**, Turtoi, M., Petrovici, A.R., Fifere, A., Pinteala, M., Calin, M., 2021. Development of Dextran-Coated Magnetic Nanoparticles Loaded with Protocatechuic Acid for Vascular Inflammation Therapy. Pharmaceutics 13, 1414. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091414. **Factor de impact la momentul publicării (2021): 4.9.**

2. Turtoi, M.#, **Anghelache, M.**#, Bucatariu, S.-M., Deleanu, M., Voicu, G., Safciuc, F., Manduteanu, I., Fundueanu, G., Simionescu, M., Calin, M., 2021. A novel platform for drug testing: Biomimetic three-dimensional hyaluronic acid-based scaffold seeded with human hepatocarcinoma cells. International Journal of Biological Macromolecules 185, 604–619. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.174. **Factor de impact la momentul publicării (2021): 7.7.**

3. Movileanu, C.#, **Anghelache, M.**#, Turtoi, M., Voicu, G., Neacsu, I.A., Ficai, D., Trusca, R., Oprea, O., Ficai, A., Andronescu, E., Calin, M., 2022. Folic acid-decorated PEGylated magnetite nanoparticles as efficient drug carriers to tumor cells overexpressing folic acid receptor. International Journal of Pharmaceutics 625, 122064. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122064. **Factor de impact la momentul publicării (2022): 5.3.**

4. **Anghelache, M.**, Voicu, G., Deleanu, M., Turtoi, M., Safciuc, F., Anton, R., Boteanu, D., Fenyo, I.M., Manduteanu, I., Simionescu, M., Calin, M., 2024. Biomimetic Nanocarriers of Pro-Resolving Lipid Mediators for Resolution of Inflammation in Atherosclerosis. Adv Healthcare Materials 13, 2302238. https://doi.org/10.1002/adhm.202302238. **Factor de impact la momentul publicării (2024): 10.**

5. **Anghelache, M.**, Voicu, G., Anton, R., Safciuc, F., Boteanu, D., Deleanu, M., Turtoi, M., Simionescu, M., Manduteanu, I., Calin, M., 2025. Inflammation resolution-based treatment of atherosclerosis using biomimetic nanocarriers loaded with specialized pro-resolving lipid mediators. Materials Today Bio 32, 101733. https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2025.101733. **Factor de impact la momentul publicării (2021): 8.7.**

- autori cu contribuție egală

Co-autor (7):

1. Turtoi, M., **Anghelache, M.**, Patrascu, A.A., Maxim, C., Manduteanu, I., Calin, M., Popescu, D.-L., 2021. Synthesis, Characterization, and In Vitro Insulin-Mimetic Activity Evaluation of Valine Schiff Base Coordination Compounds of Oxidovanadium(V). Biomedicines 9, 562. https://doi.org/10.3390/biomedicines9050562. **Factor de impact la momentul publicării (2021): 3.9.**

2. Popescu, I., Turtoi, M., Suflet, D.M., Dinu, M.V., Darie-Nita, R.N., **Anghelache, M.**, Calin, M., Constantin, M., 2021. Alginate/poloxamer hydrogel obtained by thiol-acrylate photopolymerization for the alleviation of the inflammatory response of human keratinocytes. International Journal of Biological Macromolecules 180, 418–431. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.082. **Factor de impact la momentul publicării (2021): 7.7.**

3. Fundueanu, G., Constantin, M., Turtoi, M., Bucatariu, S.-M., Cosman, B., **Anghelache, M.**, Voicu, G., Calin, M., 2022. Bio-Responsive Carriers for Controlled Delivery of Doxorubicin to Cancer Cells. Pharmaceutics 14, 865. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040865. **Factor de impact la momentul publicării (2022): 4.9.**

4. Turtoi, M., **Anghelache, M.**, Patrascu, A.A., Deleanu, M., Voicu, G., Raduca, M., Safciuc, F., Manduteanu, I., Calin, M., Popescu, D.-L., 2022. Antitumor Properties of a New Macrocyclic Tetranuclear Oxidovanadium(V) Complex with 3-Methoxysalicylidenvaline Ligand. Biomedicines 10, 1217.

https://doi.org/10.3390/biomedicines10061217. **Factor de impact la momentul publicării (2022): 3.9.**

5. Voicu, G., Mocanu, C.A., Safciuc, F., **Anghelache, M.**, Deleanu, M., Cecoltan, S., Pinteala, M., Uritu, C.M., Droc, I., Simionescu, M., Manduteanu, I., Calin, M., 2023. Nanocarriers of shRNA-Runx2 directed to collagen IV as a nanotherapeutic system to target calcific aortic valve disease. Materials Today Bio 20, 100620. https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100620. **Factor de impact la momentul publicării (2023): 8.7.**

6. Voicu, G., Mocanu, C.A., Safciuc, F., Rebleanu, D., **Anghelache, M.**, Cecoltan, S., Droc, I., Simionescu, M., Manduteanu, I., Calin, M., 2024. VCAM-1 targeted nanocarriers of shRNA-Smad3 mitigate endothelial-to-mesenchymal transition triggered by high glucose concentrations and osteogenic factors in valvular endothelial cells. International Journal of Biological Macromolecules 281, 136355. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136355. **Factor de impact la momentul publicării (2024): 7.7.**

7. Motelica, L., Voicu, G., Chircov, C., Surdu, A.V., Trusca, R.D., Vasile, B.S., Ficai, D., Oprea, O.C., Marta, D.S., Peteu, V.-E., **Anghelache, M.**, Ficai, A., Calin, M., 2025. Aspartic acid functionalized magnetic nanoparticles for enhanced internalization in tumoral cell. J Aust Ceram Soc 61, 265–283. https://doi.org/10.1007/s41779-024-01102-x. **Factor de impact la momentul publicării (2021): 1.8.**

Rezumate publicate în reviste cotate ISI – 4 (1 autor principal)

1. **Anghelache, M.**, Deleanu, M., Anton, R., Turtoi, M., Voicu, G., Mândușeanu, I., Simionescu, M., Călin, M., 2023. Pro-resolving lipid mediator-loaded biomimetic nanoparticles as promising carriers for inflammation resolution in atherosclerosis. Talks. FEBS Open Bio 13, 2–60. https://doi.org/10.1002/2211-5463.13645.

2. Voicu, G., **Anghelache, M.**, Deleanu, M., Turtoi, M., Safciuc, F., Anton, R., Mândușeanu, I., Simionescu, M., Călin, M., 2023. Dual targeting of resolvins-loaded nanoparticles to VCAM-1 and collagen IV assure their delivery to the aorta of

atherosclerotic mice, 2023. FEBS Open Bio 13, 61–258. https://doi.org/10.1002/2211-5463.13646

3. Boteanu, D., **Anghelache, M.**, Turtoi, M., Călin, M., 2025. Enhancing tumor drug delivery: targeting nucleolin with liposomes for improved therapeutic efficacy. SEE J Immunol 8, 067. https://doi.org/10.3889/seejim.2025.6130.

4. Turtoi, M., **Anghelache, M.**, Voicu, G., Safciuc, F., Deleanu, M., Călin, M., 2025. Innovative vanadium (V)-based drug: preliminary in vitro and in vivo antitumor investigations. SEE J Immunol 8, 078. https://doi.org/10.3889/seejim.2025.6141.

BREVETE ÎNREGISTRATE

1. Aplicație de patent nr. A/00388, cu data de depozit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci (OSIM) 20.07.2023 și titlul „Nanosisteme magnetice inteligente pentru vectorizarea celulară a compușilor bioactivi", autori: Movileanu C., Ficai D., Ficai A., Călin M., **Anghelache M.**, Gafencu A., Fundueanu-Constantin G., Pinteală M., Simionescu M., Andronescu E.
(https://osim.ro/images/Publicatii/Inventii/2025/bopi_inv_01_2025.pdf).

COMUNICĂRI PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE:

Prezentări orale (3):

1. **Maria Anghelache**, Preparation and characterization of macrophage-membrane coated nanoemulsions for delivery of specialized pro-resolving lipid mediators of inflammation, 38th Annual Scientific Session of The Romanian Society for Cell Biology, 4 November 2021.

2. **Maria Anghelache**, Pro-resolving Lipid Mediators-loaded Biomimetic Nanoparticles as Promising Carriers for Inflammation Resolution in Atherosclerosis, The 47th FEBS Congress, Oral presentation, Tours, France, 8-12 July 2023.

3. **Maria Anghelache**, Macrophage Membranes-Functionalized Lipid Nanoemulsions as Promising Carriers of Pro-Resolving Lipid Mediators to Atherosclerotic Lesions,

40th Annual Scientific Session of The Romanian Society for Cell Biology, Oral presentation, 16-17 November 2023.

Postere (5):

1. **Maria Anghelache**, Florentina Safciuc, Geanina Voicu, Mihaela Turtoi, Cornelia Ioana Ilie, Anton Ficai, Manuela Calin, Chitosan-coated iron oxide nanoparticles as a promising nanocarriers for gallic acid targeted delivery, "International Conferences & Exhibition on Nanotechnologies, Organic Electronics & Nanomedicine", Thessaloniki, 06-09 July 2021.
2. **Maria Anghelache**, Mariana Deleanu, Mihaela Turtoi, Geanina Voicu, Manuela Calin, Preparation and physico-chemical characterization of specialized pro-resolving lipid mediators (SPMs)-loaded nanoemulsions as nanocarriers for inflammation resolution, "International Conferences & Exhibition on Nanotechnologies, Organic Electronics & Nanomedicine", Thessaloniki, 06-09 July 2021.
3. **Maria Anghelache**, Mariana Deleanu, Mihaela Turtoi, Geanina Voicu, Manuela Calin, Development of Biomimetic Nanocarriers for delivery of Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators (SPMs) to atherosclerotic plaque, "Materials, Methods & Technologies", Burgas, Bulgaria, 19-22 August 2022.
4. **Maria Anghelache**, Mariana Deleanu, Ruxandra Anton, Mihaela Turtoi, Geanina Voicu, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Development of Biomimetic Nanocarriers for Delivery of Pro-Resolving Mediators to Atherosclerotic Plaque, "The 39th Annual Scientific Session of The Romanian Society for Cell Biology", 21-23 October 2022.
5. **Maria Anghelache**, Mariana Deleanu, Ruxandra Anton, Mihaela Turtoi, Geanina Voicu, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Specialized pro-resolving mediators (SPMs)-loaded Nanoemulsions as promising biomimetic nanocarriers for inflammation resolution, The 47th FEBS Congress, Tours, France, 8-12 July 2023.

PREMII OBȚINUTE PE PERIOADA PROGRAMULUI DOCTORAL

1. **Medalie de Aur** – „Smart nanoparticle systems for cellular internalization”, Autori: Movileanu C., Ficai D, Ficai A., Calin M., **Anghelache M.**, Gafencu A., Fundueanu-Constantin G., Pinteala M., Simionescu M., Andronescu E.; *Salonul Internațional de Invenții și Inovații "Traian Vuia"*, 12-14 octombrie 2021, Timișoara, România.
2. **Medalie de Aur** – „Smart nanoparticle systems for cellular internalization”, Autori: Movileanu C., Ficai D., Ficai A., Calin M., **Anghelache M.**, Gafencu A., Fundueanu-Constantin G., Pinteala M., Simionescu M., Andronescu E.; *Expoziția Internațională de Cercetare Științifică, Inovare și Invenții "PRO INVENT" – Ediția a XIX-a*, 20-22 octombrie 2021, Cluj-Napoca, România.
3. **Medalie de Aur** – Invenții, soiuri de plante, design industrial: „Smart nanoparticle systems for cellular internalization”, Autori: Movileanu C., Ficai D., Ficai A., Calin M., **Anghelache M.**, Gafencu A., Fundueanu-Constantin G., Pinteala M., Simionescu M., Andronescu E.; *Expoziția Internațională Specializată "INFOINVENT 2021" – Ediția a XVII-a*, 17-20 noiembrie 2021, Chișinău, Republica Moldova.

SPECIALIZĂRI ȘI CURSURI REALIZATE PE PERIOADA PROGRAMULUI DOCTORAL

1. Cursul „**Flow Cytometry Training School**”. Asociația Română de Citometrie, București, 14–15 decembrie 2020.
2. Al 9-lea Curs Internațional privind Animalele de Laborator (**FELASA**), Creta, Heraklion, mai–iunie 2023.
3. **Stagiu de cercetare CARDIOSCOPE** – „Comprehensive and personalized assessment of acute coronary syndrome by multiomic approach and artificial intelligence strategy”, HORIZON-MSCA-2021-SE-01, Multimedica, Milano, 12 martie – 11 aprilie 2025.

BURSE OBȚINUTE PE PERIOADA PROGRAMULUI DOCTORAL

1. Bursă de doctorat: Academia Română (SCOSAAR): 2020-2025
2. Bursă participare la congresul FEBS (2023)

COLABORĂRI ÎN PROIECTE DE CERCETARE

1. **PN-II-P4-ID-PCE-2020-2465** – „Terapie direcționată bazată pe nanocarrieri biomimetici pentru rezoluția inflamației în ateroscleroză (NANORES)”, director de proiect Dr. Manuela Călin.
2. **PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697** – „Terapii inteligente pentru boli non-comunicabile, bazate pe eliberarea controlată de compuși farmacologici din celule încapsulate după manipulare genetică sau bionanoparticule vectorizate (INTERA)”, director proiect: Acad. Maya Simionescu, coordonator proiect component 3 “Nanobioparticule inteligente concepute pentru vectorizarea compușilor bioactivi pentru terapia inflamației vasculare”: Dr. Manuela Călin.
3. **PNRR-III-C9-2022-I8-CF93** – „Noi strategii nanoterapeutice care țintesc mecanismele implicate în tranziția fibroblast-miofibroblast pentru tratamentul fibrozei cardiace (HeartCure)”, director de proiect Dr. Rostyslav Billy, responsabil științific instituția gazdă Dr. Manuela Călin
4. **ERANET-NANOTECMEC-Ctr. nr. 92/2025** – „Nanovehicule pentru transportul Ago/antagomiR utilizate pentru imunoreglare: o posibilă abordare în tratamentul cancerului și transplantului pulmonar (SAIL)”, director de proiect Dr. Rostyslav Billy.
5. **H2020-EU.1.2.-AMD-861878-17 (2025)** – „Dezvoltarea unor amplificatori „inteligenți” ai speciilor reactive de oxigen, specifici pentru neutrofilele polimorfonucleare aberante, pentru tratamentul bolilor inflamatoare și autoimune, al cancerului și al mieloablației. (NeutroCure)”, director de proiect Prof. Dr. Andriy Mokhir.

ACADEMIA ROMÂNĂ
Şcoala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Strategii nanoterapeutice inovatoare pentru țintirea inflamației vasculare în ateroscleroză.

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
Acad. ILEANA MÂNDUȚEANU

DOCTORAND:
MARIA FLORENTINA ANGHELACHE

2025

CUPRINS

LISTĂ ABREVIERI **6**

I. INTRODUCERE **8**

II. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII **13**

II.1. Sistemul Cardiovascular: Organizare și Funcționalitate *14*

II.1.1. Componentele sistemului cardiovascular 14

II.1.1.1. Inima 14

II.1.1.2. Vasele de sânge 14

II.2. Inflamația în Ateroscleroză *17*

II.2.1. Inflamația acută 18

II.2.2. Inflamația cronică 18

II.2.3. Mecanisme ale inflamației 19

II.2.4. Etapele formării plăcii aterosclerotice 21

II.2.4.1. Activarea celulelor endoteliale 21

II.2.4.2. Disfuncția endotelială și acumularea LDL 23

II.2.4.3. Amplificarea procesului inflamator 24

II.2.4.4. Formarea și stabilizarea plăcii aterosclerotice 26

II.2.4.5. Dezvoltarea miezului necrotic și ruptura plăcii aterosclerotice 27

II.3. Rezoluția Inflamației în Ateroscleroză *29*

II.3.1. Mediatorii specializați pro-rezoluție (SPM) 32

II.3.1.1. Biosinteza SPM și indicii de rezoluție 33

II.3.1.2. Principalele clase de SPM și rolul lor fiziologic 34

II.3.1.3. Interacțiunea SPM cu receptorii GPCR 40

II.3.2. Rolul macrofagelor în rezoluția inflamației plăcii aterosclerotice 45

II.4. Abordări Curente în Tratamentul Aterosclerozei *48*

II.4.1. Abordare non-farmacologică 48

II.4.2. Terapii de reducere a lipidelor 48

II.4.3. Terapii anti-trombotice 50

II.4.4. Terapii anti-inflamatoare 50

II.5. Nanotehnologia în Terapia Aterosclerozei *53*

II.5.1. Tipuri de nanoparticule 53

II.5.1.1. Nanoparticule anorganice 53

II.5.1.2. Nanoparticule organice 55

II.5.2. Strategii de țintire a peretelui vascular 58
II.5.2.1. Țintire pasivă 59
II.5.2.2. Țintire activă 59
II.6. Nanoterapia Aterosclerozei prin Promovarea Rezoluției Inflamației 67
II.6.1. Agenți Farmacologici pentru Rezoluția Inflamației 67
II.6.1.1. Molecule sintetice și analogi ai SPM 67
II.6.1.2. Agenți care modulează indirect căile pro-rezoluție 68
II.6.2. Nanoplatforme pentru Livrarea Mediatorilor Specializați Pro-Rezoluție sau Analogilor Acestora 69
II.6.3. Studii Clinice 72
III. CONTRIBUȚII ORIGINALE 73
A. CARACTERIZAREA ȘI TESTAREA UNUI SISTEM DE NANOPARTICULE MAGNETICE ACOPERITE CU DEXTRAN ÎNCĂRCATE CU ACID PROTOCATEHUIC ÎN TERAPIA INFLAMAȚIEI VASCULARE 74
III.A.1. Caracterizarea și evaluarea in vitro a nanoparticulelor magnetice acoperite cu dextran și încărcate cu acid protocatehuic 74
III.A.1.1. Introducere și obiective 74
III.A.1.2. Protocoale experimentale și metode de analiză 76
III.A.1.2.1. Reactivi 76
III.A.1.2.2. Sinteza nanoparticulelor magnetice (MNP) 76
III.A.1.2.3. Sinteza MNP acoperite cu dextran (MNP-Dex) 77
III.A.1.2.4. Sinteza MNP acoperite cu dextran încărcate cu PCA (MNP-Dex/PCA) 77
III.A.1.2.5. Încărcarea PCA pe MNP-Dex 77
III.A.1.2.6. Analiza morfologică a MNP-Dex/PCA 78
III.A.1.2.7. Dimensiunea și Potențialul Zeta 78
III.A.1.2.8. Modelul celular *in vitro* 78
III.A.1.2.9. Teste de citotoxicitate celulară 79
III.A.1.2.10. Internalizarea nanoparticulelor magnetice 80
III.A.1.2.11. Testul de adeziune al monocitelor 80
III.A.1.3. Rezultate 83
III.A.1.3.1. Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor magnetice încărcate cu PCA 83
III.A.1.3.2. Evaluarea *in vitro* a citotoxicității nanoparticulelor magnetice încărcate cu PCA 86
III.A.1.3.3. Localizarea intracelulară a MNP-Dex/PCA 88

III.A.1.3.4. Efectul anti-inflamator al MNP-Dex/PCA 89
III.A.1.4. Discuții și concluzii parțiale 96
B. DEZVOLTAREA UNUI SISTEM DE LIVRARE DE MEDICAMENTE BAZAT PE O STRATEGIE BIOMIMETICĂ PENTRU PROMOVAREA PROCESULUI DE REZOLUȚIE A INFLAMAȚIEI ÎN ATEROSCLEROZĂ 100
III.B.1. Sinteza şi caracterizarea nanocărăuşilor încărcaţi cu mediatori pro-rezoluţie pentru tratamentul aterosclerozei 100
III.B.1.1. Introducere și obiective 100
III.B.1.2. Protocoale experimentale și metode de analiză 102
III.B.1.2.1. Reactivi 102
III.B.1.2.2. Culturi celulare 102
III.B.1.2.3. Izolarea membranelor macrofagelor 103
III.B.1.2.4. Prepararea nanoemulsiilor lipidice (LN) încărcate cu SPM (LN/SPM) 103
III.B.1.2.5. Prepararea nanoemulsiilor lipidice biomimetice încărcate cu SPM (Bio-LN/SPM) 104
III.B.1.2.6. Determinarea dimensiunii și a potențialului Zeta 104
III.B.1.2.7. Microscopie electronică de transmisie cu colorație negativă (TEM) 105
III.B.1.2.8. Determinarea încorporării SPM în nanoemulsii 105
III.B.1.2.9. Detectarea proteinelor membranare ale macrofagelor în Bio-LN/SPM prin imunoblotting 106
III.B.1.3. Rezultate 108
III.B.1.3.1. Strategia de sinteză a nanoparticulelor biomimetice (Bio-LN/SPM) 108
III.B.1.3.2. Bio-LN/SPM prezintă în compoziția lor proteine membranare provenite de la macrofage 110
III.B.1.3.3. Bio-LN/SPM reprezintă o platformă eficientă pentru menținerea stabilității SPM 111
III.B.1.3.4. Bio-LN/SPM prezintă stabilitate ridicată pe termen lung 113
III.B.1.4. Discuții și concluzii parțiale 114
III.B.2. Utilizarea nanocărăuşilor pentru transportul mediatorilor pro-rezoluţie in vitro, la nivelul celulelor vasculare şi imune implicate in evoluţia ateromului. 116
III.B.2.1. Introducere și obiective 116
III.B.2.2. Protocoale experimentale și metode de analiză 117
III.B.2.2.1. Sinteza nanoparticulelor biomimetice (Bio-LN/SPM) 117

III.B.2.2.2. Modelul celular *in vitro* ... 117
III.B.2.3. Rezultate ... 123
III.B.2.3.1. Viabilitatea celulară și internalizarea Bio-LN/SPM de către celule endoteliale, celule musculare netede și macrofage ... 123
III.B.2.3.2. Legarea Bio-LN/SPM la suprafața celulelor endoteliale, celulelor musculare netede și macrofagelor; rolul receptorilor SPM ... 126
III.B.2.3.3. Bio-LN/SPM au un rol funcțional în inhibarea adeziunii monocitelor și transmigrării acestora către/prin celulele endoteliale activate ... 130
III.B.2.3.4. Expunerea la Bio-LN/SPM crește activitatea fagocitară a macrofagelor ... 132
III.B.2.3.5. Expunerea la Bio-LN/SPM reduce expresia proteinelor asociate cu procesul inflamator în celulele endoteliale, celulele musculare netede și macrofage ... 133
III.B.2.4. Discuții și concluzii parțiale ... 135
III.B.3. Utilizarea nanocăruşilor pentru transportul direcționat al mediatorilor pro-rezoluție la nivelul plăcilor aterosclerotice în modelul murin ApoE$^{-/-}$ în scopul rezoluției inflamației ... 138
III.B.3.1. Introducere și Obiective ... 138
III.B.3.2. Protocoale experimentale și metode de analiză ... 140
III.B.3.2.1. Modelul animal de ateroscleroză ... 140
III.B.3.2.2. Testul de hemocompatibilitate ... 140
III.B.3.2.3. Evaluarea funcției hepatice și renale ... 141
III.B.3.2.4. Mouse cytokine array ... 141
III.B.3.2.5. Evaluarea celulelor imune ... 142
III.B.3.2.6. Imagistica *ex vivo* a biodistribuției nanoparticulelor biomimetice ... 142
III.B.3.2.7. Colorația Oil Red O (ORO) ... 143
III.B.3.2.8. Analiza statistică ... 143
III.B.3.3. Rezultate ... 144
III.B.3.3.1. Bio-LN/SPM pot fi administrate *in vivo* fără a induce efecte secundare acute ... 144
III.B.3.3.2. Bio-LN/SPM se acumulează în leziunile aterosclerotice ale șoarecilor ApoE$^{-/-}$ ... 148
III.B.3.4. Discuții și concluzii parțiale ... 151
III.B.4. Evaluarea efectului terapeutic al nanocăruşilor biomimetici încărcați cu mediatori pro-rezoluție asupra dezvoltării plăcii aterosclerotice ... 154
III.B.4.1. Introducere și obiective ... 154
III.B.4.2. Protocoale experimentale și metode de analiză ... 157

III.B.4.2.1. Sinteza și caracterizarea nanoemulsiilor lipidice biomimetice încărcate cu SPMs (Bio-LN/SPMs) 157
III.B.4.2.2. Model animal de ateroscleroză și strategie de tratament 158
III.B.4.2.3. Prelevarea și procesarea țesuturilor 159
III.B.4.2.4. Investigații plasmatice 159
III.B.4.2.5. Investigații prin citometrie în flux 160
III.B.4.2.6. Investigații asupra aortei 161
III.B.4.2.7. Analiza statistică 166
III.B.4.3. Rezultate 167
III.B.4.3.1. Prepararea și caracterizarea Bio-LN/SPM 167
III.B.4.3.2. Administrarea in vivo a Bio-LN/SPMs îmbunătățește metabolismul lipidic și funcția renală și nu prezintă toxicitate hepatică detectabilă 168
III.B.4.3.3. Bio-LN/SPMs reduc producția de proteine plasmatice asociate cu activarea complementului și inflamației 170
III.B.4.3.4. Bio-LN/SPMs induc un profil anti-inflamator în monocitele circulatorii 171
III.B.4.3.5. Bio-LN/SPMs promovează rezoluția inflamației prin reducerea expresiei MCP-1 și a monocitelor infiltrate în arterele șoarecilor 174
III.B.4.3.6. Bio-LN/SPMs facilitează rezoluția inflamației prin exercitarea unui efect anti-inflamator în aorta șoarecilor ApoE$^{-/-}$ 176
III.B.4.3.7. Bio-LN/SPM promovează rezoluția inflamației în placa aterosclerotică prin polarizarea macrofagelor către un fenotip reparator de tip M2 177
III.B.4.3.8. Tratamentul cu Bio-LN/SPM atenuează inflamația și stimulează rezoluția acesteia în leziunile de la nivelul rădăcinii aortice. 179
III.B.4.3.9. Tratamentul cu Bio-LN/SPM reduce depozitele de lipide în plăcile aterosclerotice ale șoarecilor ApoE$^{-/-}$ 181
III.B.4.4. Discuții și concluzii parțiale 183
IV. CONCLUZII GENERALE 189
V. BIBLIOGRAFIE 192

REZUMAT

Cuvinte cheie: ateroscleroză, inflamație vasculară, rezoluția inflamației, mediatori specializați pro-rezoluție, nanoterapie, nanoparticule biomimetice, celule endoteliale, celule musculare netede vasculare, macrofage.

Număr total de pagini – 237

Număr de figuri în Partea I – 12

Număr de tabele în Partea I – 1

Număr de figuri în Partea II – 41

Număr de tabele în Partea II –8

Referințe bibliografice – 400

Lucrări publicate în reviste indexate ISI în perioada stagiului de doctorat – 12 (5 autor principal)

Rezumate publicate în reviste indexate ISI – 4 (1 autor principal)

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale – 5 (autor principal)

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – 3 (autor principal)

Brevete – 1

Burse obținute pe durata programului doctoral – 2

Specializări și cursuri efectuate – 3

Premii – 3

Participarea în proiecte de cercetare – 5

A. Introducere și obiective

Bolile cardiovasculare (BCV) reprezintă principala cauză de mortalitate în România, responsabile pentru peste 55% dintre decesele anuale (Institutul Național de Sănătate Publică, 2024). În acest context, ateroscleroza (AS), o afecțiune cronică inflamatoare a peretelui vascular, joacă un rol central în dezvoltarea complicațiilor cardiovasculare acute, precum infarctul miocardic sau accidentul vascular cerebral. Deși terapiile convenționale, cum ar fi statinele și agenții antitrombotici, reduc incidența evenimentelor cardiovasculare, acestea nu reușesc să abordeze eficient inflamația vasculară persistentă, o componentă esențială a progresiei plăcii aterosclerotice (d'Aiello et al., 2024).

În mod particular, s-a demonstrat că eșecul rezoluției inflamației, proces fiziologic activ și coordonat, contribuie semnificativ la instabilitatea plăcilor și progresia bolii (Fredman, 2019). În acest context, mediatori specializați pro-rezoluție (SPM) precum resolvinele sau lipoxinele, reprezintă o clasă emergentă de molecule capabile să restabilească homeostazia vasculară prin inducerea activă a rezoluției inflamației. Cu toate acestea, utilizarea terapeutică a SPM este limitată de stabilitatea lor redusă în circulație și de biodisponibilitatea scăzută la locul leziunii aterosclerotice (Fredman & Serhan, 2024).

În paralel, compuși naturali precum acidul protocatehuic (PCA), cu rol anti-inflamator și antioxidant, au fost propuși ca adjuvanți în combaterea inflamației endoteliale și macrofagice. Totuși, eficacitatea lor terapeutică este limitată de biodisponibilitatea redusă și țintirea nespecifică (Cory et al., 2018). Nanotehnologia oferă o soluție inovatoare pentru aceste provocări, facilitând livrarea țintită și protejarea compușilor de interes în forme farmaceutice stabile (Ahmad et al., 2022).

Pornind de la aceste premise, **scopul principal al acestei teze de doctorat** a fost dezvoltarea și caracterizarea unor **platforme nanoterapeutice inovatoare** pentru combaterea inflamației vasculare în AS, având ca mecanisme complementare: (1) inducerea activă a rezoluției inflamației prin livrarea de SPM sau (2) inhibarea căilor inflamatoare pro-aterogene prin livrarea de PCA.

Au fost propuse și realizate următoarele **obiective specifice**:

1. Caracterizarea și testarea unor nanoparticule magnetice acoperite cu dextran și încărcate cu acid protocatehuic (MNP-Dex/PCA), cu scopul de a inhiba inflamația

vasculară prin reducerea expresiei citokinelor pro-inflamatoare și a adeziunii monocitelor la celulele endoteliale (CE) activate, în modele celulare *in vitro*.

2. Dezvoltarea și caracterizarea unor nanoparticule biomimetice încărcate cu SPM (Bio-LN/SPM) și testarea efectului acestora *in vitro* asupra fenotipului inflamator al CE, macrofagelor (Mφ) și celulelor musculare netede (CMN) implicate în patogeneza AS.
3. Evaluarea biodistribuției și a efectelor acute ale nanoparticulelor Bio-LN/SPM în modelul murin de AS (șoareci ApoE $^{-/-}$ hiperlipidemici), prin analizarea acumulării la nivelul aortei, a modificărilor în compoziția celulelor imune circulante și a profilului de citokine inflamatoare, la 24 de ore de la administrare.
4. Validarea eficacității preclinice a strategiei nanoterapeutice pro-rezolutive în AS, în modelul murin ApoE $^{-/-}$, prin demonstrarea efectului terapeutic al nanoparticulelor Bio-LN/SPM asupra leziunilor aterosclerotice aflate în două stadii de progresie a plăcii, cu accent pe reducerea inflamației vasculare și acumulării lipidice în aortă și rădăcina aortică.

B. Structura tezei

Teza de doctorat este structurată în două părți majore:

Partea I – Stadiul actual al cunoașterii cuprinde o analiză a literaturii de specialitate privind rolul inflamației în ateroscleroză (AS), mecanismele moleculare implicate în rezoluția acesteia și strategiile nanoterapeutice emergente, care pot influența pozitiv cursul bolii. Această parte este alcătuită din șase capitole, care oferă o bază teoretică solidă pentru dezvoltarea celor două direcții experimentale.

În ***capitolul 1*** este prezentată organizarea structurală și funcțională a sistemului cardiovascular, cu accent pe arhitectura peretelui arterial și pe rolul critic al celulelor endoteliale în menținerea homeostaziei vasculare. Sunt discutate dezechilibrele care pot perturba funcția endotelială și care contribuie la declanșarea patologiilor vasculare, precum AS.

Capitolul 2, „Inflamația în Ateroscleroză”, detaliază în mod sistematic etapele progresiei leziunilor aterosclerotice, pornind de la activarea endotelială și acumularea

LDL în spațiul subendotelial, până la formarea celulelor spumoase, a miezului necrotic și ruperea plăcii. Sunt evidențiate procesele inflamatoare care amplifică vulnerabilitatea plăcii și sunt discutate elementele celulare implicate.

Capitolul 3 este dedicat conceptului de „Rezoluție a inflamației" ca proces activ și cu mecanisme de reglare complexe, diferit de inhibarea clasică a inflamației. Este prezentat un cadru conceptual complet privind mediatorii specializați pro-rezoluție (SPM), precum lipoxinele, resolvinele, maresinele și protectinele, accentuând rolul lor în restabilirea homeostaziei tisulare. O sinteză extinsă a claselor, funcțiilor, mecanismelor de acțiune și receptorilor acestor mediatori a fost detaliată în cadrul acestui capitol, constituind baza teoretică pentru strategiile farmacologice pro-rezolutive propuse ulterior în partea experimentală a tezei.

Capitolul 4 evidențiază limitările terapiilor convenționale actuale, care vizează în principal scăderea nivelului lipidelor sau suprimarea răspunsului inflamator. Se argumentează că aceste strategii nu reușesc să prevină progresia leziunilor aterosclerotice și nu abordează cauza persistenței inflamației. Astfel, este justificată necesitatea unor intervenții terapeutice inovatoare, capabile nu doar să inhibe inflamația, ci și să activeze mecanismele fiziologice de rezoluție, promovând restaurarea homeostaziei vasculare.

Capitolul 5 introduce domeniul nanomedicinei, cu accent pe nanoterapia aplicată în bolile cardiovasculare. Sunt detaliate tipurile de nanoparticule utilizate în acest context, punându-se accent pe avantajele livrării direcționate și pe strategiile de funcționalizare menite să crească eficiența terapeutică. De asemenea, este prezentat conceptul de nanoparticule biomimetice, cu evidențierea potențialului acestora de a imita componente celulare naturale pentru a facilita recunoașterea specifică a țesuturilor inflamate și a îmbunătăți distribuția țintită a agenților terapeutici.

Capitolul 6 explorează aplicațiile directe ale SPM și ale analogilor lor sintetici în inflamația cronică și în AS. Sunt descrise studii preclinice și potențiale direcții de cercetare în care SPM sunt considerați terapii promițătoare, cu mecanisme complementare față de medicamentele anti-inflamatoare tradiționale.

Partea a II-a – Contribuții originale este dedicată studiilor experimentale realizate, împărțite în două direcții nanoterapeutice distincte:

Capitolul 1 descrie dezvoltarea, caracterizarea și evaluarea *in vitro* a nanoparticulelor magnetice acoperite cu dextran și încărcate cu acid protocatehuic (MNP-Dex/PCA). Studiul demonstrează eficiența acestor nanoparticule în reducerea expresiei citokinelor pro-inflamatoare în celulele endoteliale și în macrofagele de tip M1. De asemenea, MNP-Dex/PCA inhibă căile de semnalizare NF-κB și MAPK și reduc adeziunea monocitelor la endoteliul activat, susținând potențialul acestora în terapia inflamației vasculare.

Capitolul 2 este dedicat unui studiu amplu ce cuprinde secțiuni experimentale care vizează promovarea activă a rezoluției inflamației prin utilizarea de nanoparticule biomimetice încărcate cu mediatori specializați pro-rezoluție (Bio-LN/SPM).

- Secțiunea 1 prezintă procesul de sinteză și caracterizare fizico-chimică a nanoparticulelor biomimetice, inclusiv evaluarea compoziției, dimensiunii și potențialului zeta.
- Secțiunea 2 analizează efectele *in vitro* ale acestor nanoparticule asupra liniilor celulare relevante pentru AS (CE, Mϕ și SMC). S-a constatat o scădere semnificativă a expresiei markerilor inflamatori și promovarea unui fenotip anti-inflamator.
- Secțiunea 3 se concentrează pe testarea *in vivo* a Bio-LN/SPM în modelul murin $ApoE^{-/-}$, la 24 de ore post-injectare. Au fost evaluate distribuția nanoparticulelor și efectele acute asupra profilului imun.
- Secțiunea 4 investighează impactul terapeutic al Bio-LN/SPM asupra leziunilor aterosclerotice ale șoarecilor $ApoE^{-/-}$ aflate în două stadii diferite de progresie (4 săptămâni și 8 săptămâni de dietă bogată în grăsimi), evidențiind reducerea inflamației sistemice și locale și a acumulării de lipide, precum și inducerea unui fenotip pro-rezolutiv al macrofagelor de la nivelul plăcii aterosclerotice.

Astfel, structura tezei reflectă o abordare integrată și progresivă, de la înțelegerea detaliată a patologiei AS și a proceselor moleculare implicate în inflamație și rezoluție, până la dezvoltarea și validarea experimentală a unor soluții terapeutice inovatoare. Fiecare capitol contribuie logic și științific la consolidarea ipotezei de cercetare și la demonstrarea aplicabilității nanomedicinei în tratamentul personalizat al inflamației vasculare asociate AS.

C. Principalele rezultate și concluzii:

1. Obținerea nanoparticulelor magnetice MNP-Dex/PCA care pot fi folosite ca vehicule teranostice ce combină diagnosticul și terapia într-o singură platformă

- Au fost obținute nanoparticule stabile coloidal în care PCA a fost eficient adsorbit pe suprafața nanoparticulelor și menținut în formă activă.
- MNP-Dex/PCA au fost preluate eficient de celulele endoteliale și de macrofagele pro-inflamatoare M1, fără efecte citotoxice la concentrații < 100 μg/mL.
- Tratamentul cu MNP-Dex/PCA a determinat:
    - Inhibarea căilor de semnalizare inflamatorii NF-κB și MAPK cu reducerea expresiei IL-1β, TNF-α, IL-6, MCP-1, p38 și ERK1/2.
    - Diminuarea adeziunii monocitelor la endoteliul activat.

Aceste date confirmă potențialul acestor nanoparticule de a inhiba răspunsul inflamator vascular, deschizând posibilitatea utilizării lor în prevenția progresiei plăcii aterosclerotice.

2. Obținerea și validarea preclinică a nanoparticulelor biomimetice încărcate cu mediatori specializați pro-rezoluție într-un model murin de ateroscleroză

- S-au obținut nanoemulsii acoperite cu membrane celulare pentru a mima structura monocitelor circulante, având ca încărcătură activă SPM (Bio-LN/SPM).
- *In vitro,* Bio-LN/SPM:
    - Au redus expresia markerilor inflamatori (VCAM-1, MCP-1, NLRP3, IL-1β),
    - Au promovat un fenotip M2 pro-rezolutiv în macrofage (scăderea iNOS și creșterea capacității fagocitare),
    - Au diminuat adeziunea și transmigrarea monocitelor prin endoteliul activat.
- *In vivo* (șoareci $ApoE^{-/-}$ hrăniți cu dietă bogată în grăsimi):
    - Administrarea intravenoasă a Bio-LN/SPM a dus, după 24 de ore, la:
        - Reducerea monocitelor și neutrofilelor circulante,
        - Scăderea nivelurilor plasmatice de citokine (IFN-γ, CXCL10, IL-16, TIMP-1 și TNF-α) și chemokine (MCP-1 și C5a),
        - Acumulare selectivă la nivelul aortei.

- Administrarea repetată în două stadii diferite de progresie a plăcii aterosclerotice a demonstrat:
  - Scăderea inflamației sistemice și modularea populațiilor imune circulante,
  - Reducerea inflamației locale și inducerea unui fenotip pro-rezolutiv de tip M2 în macrofagele aortice, evidențiată prin creșterea expresiei markerilor CD206 și MerTK, concomitent cu scăderea nivelului iNOS,
  - Reducerea acumulării lipidice în leziuni.

Aceste rezultate confirmă faptul că Bio-LN/SPM nu doar inhibă inflamația, ci promovează rezoluția acesteia, reprogramând fenotipul imun și micromediul aortic.

D. Contribuțiile originale ale tezei

1. Dezvoltarea a două platforme nanoterapeutice cu mecanisme complementare, validate *in vitro* sau *in vivo*, pentru combaterea inflamației vasculare:

a) MNP-Dex/PCA – efect anti-inflamator prin inhibarea NF-κB și MAPK (Figura 1).

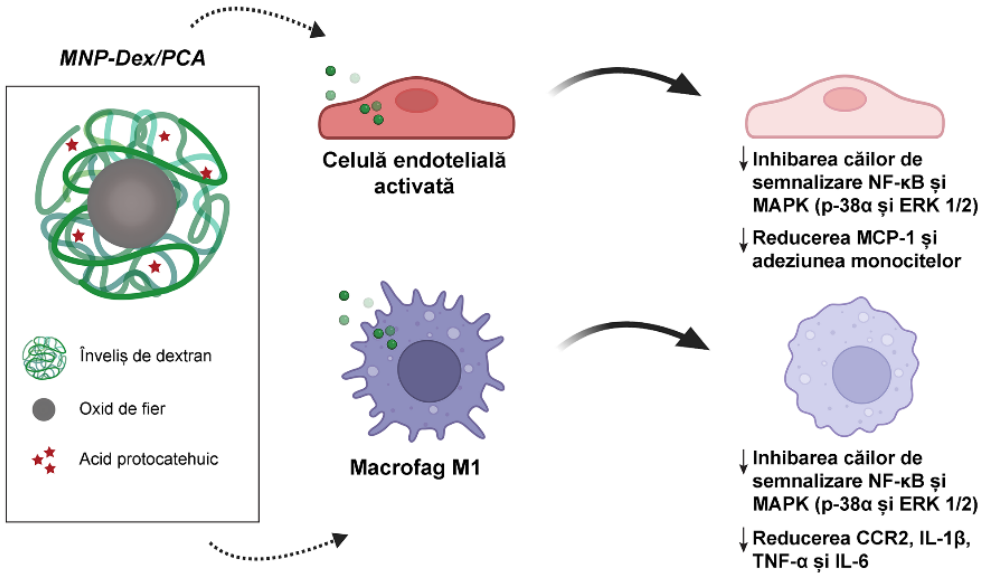


Figura 1. Strategia nanoterapeutică dezvoltată în cadrul primului studiu pentru combaterea inflamației vasculare asociate AS. Schema ilustrează mecanismul de acțiune al nanoparticulelor magnetice acoperite cu dextran și încărcate cu acid protocatehuic (MNP-Dex/PCA), care sunt internalizate de CE și MΦ de tip M1, determinând inhibarea căilor de semnalizare inflamatorii (NF-κB și MAPK p38α și ERK1/2) și limitarea adeziunii monocitelor.

b) Bio-LN/SPM – efect pro-rezolutiv, prin inducerea unui fenotip M2 în macrofage, scăderea merkerilor inflamatori și reducerea depozitelor lipidice în placa aterosclerotică (Figura 2).

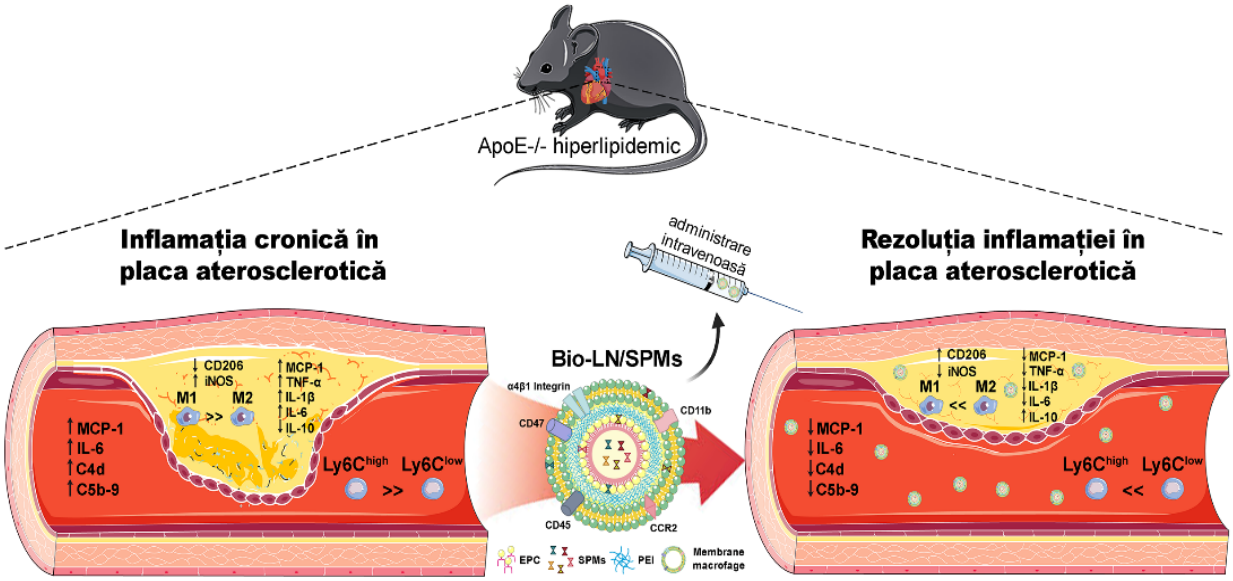


Figura 2. Reprezentare schematică a strategiei nanoterapeutice dezvoltate în cel de-al doilea studiu în vederea promovării rezoluției inflamației vasculare asociate AS. Este ilustrat efectul nanoparticulelor biomimetice încărcate cu mediatori specializați pro-rezoluție (Bio-LN/SPM) asupra CE, CMN vasculare și MΦ în modelul murin ApoE$^{-/-}$ hiperlipidemic. Tratamentul cu Bio-LN/SPM determină reducerea expresiei markerilor inflamatori circulanți și locali, inducerea unui fenotip reparator în MΦ și diminuarea acumulării lipidice în leziunile aterosclerotice.

2. Confirmarea rolului rezoluției inflamatorii în controlul AS și validarea SPM ca agenți terapeutici viabili în nanomedicina cardiovasculară.

E. Concluzii generale

Această teză aduce o contribuție semnificativă la înțelegerea și tratarea inflamației vasculare cronice în contextul AS, propunând două abordări nanoterapeutice complementare. În timp ce MNP-Dex/PCA inhibă căile inflamatorii pro-aterogene, Bio-LN/SPM promovează activ rezoluția inflamației, un proces esențial, dar ignorat până recent în tratamentele actuale. Prin aceste strategii, lucrarea demonstrează aplicabilitatea nanomedicinei în terapia cardiovasculară personalizată, deschizând noi direcții pentru intervenția precoce și țintită în AS.

F. Bibliografie

1. Ahmad, M. Z., Bhatnagar, D., Ladhe, S., Kumar, D., Pathak, K., Das, R. J., Sarma, H., & Mustafa, G. (2022). Liposomes and Niosomes for Targeted Drug and Gene Delivery Systems. In *Nanotechnology in the Life Sciences*. https://doi.org/10.1007/978-3-031-12658-1_12
2. Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 5). https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087
3. d'Aiello, A., Filomia, S., Brecciaroli, M., Sanna, T., Pedicino, D., & Liuzzo, G. (2024). Targeting Inflammatory Pathways in Atherosclerosis: Exploring New Opportunities for Treatment. *Current Atherosclerosis Reports*, *26*(12), 707–719. https://doi.org/10.1007/s11883-024-01241-3
4. Fredman, G. (2019). Can Inflammation-Resolution Provide Clues to Treat Patients According to Their Plaque Phenotype? *Frontiers in Pharmacology*, *10*(MAR). https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00205
5. Fredman, G., & Serhan, C. N. (2024). Specialized pro-resolving mediators in vascular inflammation and atherosclerotic cardiovascular disease. In *Nature Reviews Cardiology*. https://doi.org/10.1038/s41569-023-00984-x
6. Institutul Național de Sănătate Publică. (2024). *Analiză de situație privind problematica bolilor cardiovasculare*.

EFICIENȚA ȘI DISEMINAREA CERCETĂRILOR

Lucrări publicate în reviste internaţionale cotate ISI (12 lucrări)

Autor principal (5):

1. **Anghelache, M.**, Turtoi, M., Petrovici, A.R., Fifere, A., Pinteala, M., Calin, M., 2021. Development of Dextran-Coated Magnetic Nanoparticles Loaded with Protocatechuic Acid for Vascular Inflammation Therapy. Pharmaceutics 13, 1414. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091414. **Factor de impact la momentul publicării (2021): 4.9.**

2. Turtoi, M.#, **Anghelache, M.**#, Bucatariu, S.-M., Deleanu, M., Voicu, G., Safciuc, F., Manduteanu, I., Fundueanu, G., Simionescu, M., Calin, M., 2021. A novel platform for drug testing: Biomimetic three-dimensional hyaluronic acid-based scaffold seeded with human hepatocarcinoma cells. International Journal of Biological Macromolecules 185, 604–619. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.174. **Factor de impact la momentul publicării (2021): 7.7.**

3. Movileanu, C.#, **Anghelache, M.**#, Turtoi, M., Voicu, G., Neacsu, I.A., Ficai, D., Trusca, R., Oprea, O., Ficai, A., Andronescu, E., Calin, M., 2022. Folic acid-decorated PEGylated magnetite nanoparticles as efficient drug carriers to tumor cells overexpressing folic acid receptor. International Journal of Pharmaceutics 625, 122064. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122064. **Factor de impact la momentul publicării (2022): 5.3.**

4. **Anghelache, M.**, Voicu, G., Deleanu, M., Turtoi, M., Safciuc, F., Anton, R., Boteanu, D., Fenyo, I.M., Manduteanu, I., Simionescu, M., Calin, M., 2024. Biomimetic Nanocarriers of Pro-Resolving Lipid Mediators for Resolution of Inflammation in Atherosclerosis. Adv Healthcare Materials 13, 2302238. https://doi.org/10.1002/adhm.202302238. **Factor de impact la momentul publicării (2024): 10.**

5. **Anghelache, M.**, Voicu, G., Anton, R., Safciuc, F., Boteanu, D., Deleanu, M., Turtoi, M., Simionescu, M., Manduteanu, I., Calin, M., 2025. Inflammation resolution-based treatment of atherosclerosis using biomimetic nanocarriers loaded with specialized pro-resolving lipid mediators. Materials Today Bio 32, 101733. https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2025.101733. **Factor de impact la momentul publicării (2021): 8.7.**

- autori cu contribuție egală

Co-autor (7):

1. Turtoi, M., **Anghelache, M.**, Patrascu, A.A., Maxim, C., Manduteanu, I., Calin, M., Popescu, D.-L., 2021. Synthesis, Characterization, and In Vitro Insulin-Mimetic Activity Evaluation of Valine Schiff Base Coordination Compounds of Oxidovanadium(V). Biomedicines 9, 562. https://doi.org/10.3390/biomedicines9050562. **Factor de impact la momentul publicării (2021): 3.9.**

2. Popescu, I., Turtoi, M., Suflet, D.M., Dinu, M.V., Darie-Nita, R.N., **Anghelache, M.**, Calin, M., Constantin, M., 2021. Alginate/poloxamer hydrogel obtained by thiol-acrylate photopolymerization for the alleviation of the inflammatory response of human keratinocytes. International Journal of Biological Macromolecules 180, 418–431. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.082. **Factor de impact la momentul publicării (2021): 7.7.**

3. Fundueanu, G., Constantin, M., Turtoi, M., Bucatariu, S.-M., Cosman, B., **Anghelache, M.**, Voicu, G., Calin, M., 2022. Bio-Responsive Carriers for Controlled Delivery of Doxorubicin to Cancer Cells. Pharmaceutics 14, 865. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040865. **Factor de impact la momentul publicării (2022): 4.9.**

4. Turtoi, M., **Anghelache, M.**, Patrascu, A.A., Deleanu, M., Voicu, G., Raduca, M., Safciuc, F., Manduteanu, I., Calin, M., Popescu, D.-L., 2022. Antitumor Properties of a New Macrocyclic Tetranuclear Oxidovanadium(V) Complex with 3-Methoxysalicylidenvaline Ligand. Biomedicines 10, 1217.

https://doi.org/10.3390/biomedicines10061217. **Factor de impact la momentul publicării (2022): 3.9.**

5. Voicu, G., Mocanu, C.A., Safciuc, F., **Anghelache, M.**, Deleanu, M., Cecoltan, S., Pinteala, M., Uritu, C.M., Droc, I., Simionescu, M., Manduteanu, I., Calin, M., 2023. Nanocarriers of shRNA-Runx2 directed to collagen IV as a nanotherapeutic system to target calcific aortic valve disease. Materials Today Bio 20, 100620. https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100620. **Factor de impact la momentul publicării (2023): 8.7.**

6. Voicu, G., Mocanu, C.A., Safciuc, F., Rebleanu, D., **Anghelache, M.**, Cecoltan, S., Droc, I., Simionescu, M., Manduteanu, I., Calin, M., 2024. VCAM-1 targeted nanocarriers of shRNA-Smad3 mitigate endothelial-to-mesenchymal transition triggered by high glucose concentrations and osteogenic factors in valvular endothelial cells. International Journal of Biological Macromolecules 281, 136355. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136355. **Factor de impact la momentul publicării (2024): 7.7.**

7. Motelica, L., Voicu, G., Chircov, C., Surdu, A.V., Trusca, R.D., Vasile, B.S., Ficai, D., Oprea, O.C., Marta, D.S., Peteu, V.-E., **Anghelache, M.**, Ficai, A., Calin, M., 2025. Aspartic acid functionalized magnetic nanoparticles for enhanced internalization in tumoral cell. J Aust Ceram Soc 61, 265–283. https://doi.org/10.1007/s41779-024-01102-x. **Factor de impact la momentul publicării (2021): 1.8.**

Rezumate publicate în reviste cotate ISI – 4 (1 autor principal)

1. **Anghelache, M.**, Deleanu, M., Anton, R., Turtoi, M., Voicu, G., Mândușeanu, I., Simionescu, M., Călin, M., 2023. Pro-resolving lipid mediator-loaded biomimetic nanoparticles as promising carriers for inflammation resolution in atherosclerosis. Talks. FEBS Open Bio 13, 2–60. https://doi.org/10.1002/2211-5463.13645.

2. Voicu, G., **Anghelache, M.**, Deleanu, M., Turtoi, M., Safciuc, F., Anton, R., Mândușeanu, I., Simionescu, M., Călin, M., 2023. Dual targeting of resolvins-loaded nanoparticles to VCAM-1 and collagen IV assure their delivery to the aorta of

atherosclerotic mice, 2023. FEBS Open Bio 13, 61–258. https://doi.org/10.1002/2211-5463.13646

3. Boteanu, D., **Anghelache, M.**, Turtoi, M., Călin, M., 2025. Enhancing tumor drug delivery: targeting nucleolin with liposomes for improved therapeutic efficacy. SEE J Immunol 8, 067. https://doi.org/10.3889/seejim.2025.6130.

4. Turtoi, M., **Anghelache, M.**, Voicu, G., Safciuc, F., Deleanu, M., Călin, M., 2025. Innovative vanadium (V)-based drug: preliminary in vitro and in vivo antitumor investigations. SEE J Immunol 8, 078. https://doi.org/10.3889/seejim.2025.6141.

BREVETE ÎNREGISTRATE

1. Aplicație de patent nr. A/00388, cu data de depozit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci (OSIM) 20.07.2023 și titlul „Nanosisteme magnetice inteligente pentru vectorizarea celulară a compușilor bioactivi", autori: Movileanu C., Ficai D., Ficai A., Călin M., **Anghelache M.**, Gafencu A., Fundueanu-Constantin G., Pinteală M., Simionescu M., Andronescu E.
(https://osim.ro/images/Publicatii/Inventii/2025/bopi_inv_01_2025.pdf).

COMUNICĂRI PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE:

Prezentări orale (3):

1. **Maria Anghelache**, Preparation and characterization of macrophage-membrane coated nanoemulsions for delivery of specialized pro-resolving lipid mediators of inflammation, 38th Annual Scientific Session of The Romanian Society for Cell Biology, 4 November 2021.

2. **Maria Anghelache**, Pro-resolving Lipid Mediators-loaded Biomimetic Nanoparticles as Promising Carriers for Inflammation Resolution in Atherosclerosis, The 47th FEBS Congress, Oral presentation, Tours, France, 8-12 July 2023.

3. **Maria Anghelache**, Macrophage Membranes-Functionalized Lipid Nanoemulsions as Promising Carriers of Pro-Resolving Lipid Mediators to Atherosclerotic Lesions,

40th Annual Scientific Session of The Romanian Society for Cell Biology, Oral presentation, 16-17 November 2023.

Postere (5):

1. **Maria Anghelache**, Florentina Safciuc, Geanina Voicu, Mihaela Turtoi, Cornelia Ioana Ilie, Anton Ficai, Manuela Calin, Chitosan-coated iron oxide nanoparticles as a promising nanocarriers for gallic acid targeted delivery, "International Conferences & Exhibition on Nanotechnologies, Organic Electronics & Nanomedicine", Thessaloniki, 06-09 July 2021.
2. **Maria Anghelache**, Mariana Deleanu, Mihaela Turtoi, Geanina Voicu, Manuela Calin, Preparation and physico-chemical characterization of specialized pro-resolving lipid mediators (SPMs)-loaded nanoemulsions as nanocarriers for inflammation resolution, "International Conferences & Exhibition on Nanotechnologies, Organic Electronics & Nanomedicine", Thessaloniki, 06-09 July 2021.
3. **Maria Anghelache**, Mariana Deleanu, Mihaela Turtoi, Geanina Voicu, Manuela Calin, Development of Biomimetic Nanocarriers for delivery of Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators (SPMs) to atherosclerotic plaque, "Materials, Methods & Technologies", Burgas, Bulgaria, 19-22 August 2022.
4. **Maria Anghelache**, Mariana Deleanu, Ruxandra Anton, Mihaela Turtoi, Geanina Voicu, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Development of Biomimetic Nanocarriers for Delivery of Pro-Resolving Mediators to Atherosclerotic Plaque, "The 39th Annual Scientific Session of The Romanian Society for Cell Biology", 21-23 October 2022.
5. **Maria Anghelache**, Mariana Deleanu, Ruxandra Anton, Mihaela Turtoi, Geanina Voicu, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Specialized pro-resolving mediators (SPMs)-loaded Nanoemulsions as promising biomimetic nanocarriers for inflammation resolution, The 47th FEBS Congress, Tours, France, 8-12 July 2023.

PREMII OBȚINUTE PE PERIOADA PROGRAMULUI DOCTORAL

1. **Medalie de Aur** – „Smart nanoparticle systems for cellular internalization”, Autori: Movileanu C., Ficai D, Ficai A., Calin M., **Anghelache M.**, Gafencu A., Fundueanu-Constantin G., Pinteala M., Simionescu M., Andronescu E.; *Salonul Internațional de Invenții și Inovații "Traian Vuia"*, 12-14 octombrie 2021, Timișoara, România.
2. **Medalie de Aur** – „Smart nanoparticle systems for cellular internalization”, Autori: Movileanu C., Ficai D., Ficai A., Calin M., **Anghelache M.**, Gafencu A., Fundueanu-Constantin G., Pinteala M., Simionescu M., Andronescu E.; *Expoziția Internațională de Cercetare Științifică, Inovare și Invenții "PRO INVENT" – Ediția a XIX-a*, 20-22 octombrie 2021, Cluj-Napoca, România.
3. **Medalie de Aur** – Invenții, soiuri de plante, design industrial: „Smart nanoparticle systems for cellular internalization”, Autori: Movileanu C., Ficai D., Ficai A., Calin M., **Anghelache M.**, Gafencu A., Fundueanu-Constantin G., Pinteala M., Simionescu M., Andronescu E.; *Expoziția Internațională Specializată "INFOINVENT 2021" – Ediția a XVII-a*, 17-20 noiembrie 2021, Chișinău, Republica Moldova.

SPECIALIZĂRI ȘI CURSURI REALIZATE PE PERIOADA PROGRAMULUI DOCTORAL

1. Cursul „**Flow Cytometry Training School**”. Asociația Română de Citometrie, București, 14–15 decembrie 2020.
2. Al 9-lea Curs Internațional privind Animalele de Laborator (**FELASA**), Creta, Heraklion, mai–iunie 2023.
3. **Stagiu de cercetare CARDIOSCOPE** – „Comprehensive and personalized assessment of acute coronary syndrome by multiomic approach and artificial intelligence strategy”, HORIZON-MSCA-2021-SE-01, Multimedica, Milano, 12 martie – 11 aprilie 2025.

BURSE OBȚINUTE PE PERIOADA PROGRAMULUI DOCTORAL

1. Bursă de doctorat: Academia Română (SCOSAAR): 2020-2025
2. Bursă participare la congresul FEBS (2023)

COLABORĂRI ÎN PROIECTE DE CERCETARE

1. **PN-II-P4-ID-PCE-2020-2465** – „Terapie direcționată bazată pe nanocarrieri biomimetici pentru rezoluția inflamației în ateroscleroză (NANORES)”, director de proiect Dr. Manuela Călin.
2. **PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697** – „Terapii inteligente pentru boli non-comunicabile, bazate pe eliberarea controlată de compuși farmacologici din celule încapsulate după manipulare genetică sau bionanoparticule vectorizate (INTERA)”, director proiect: Acad. Maya Simionescu, coordonator proiect component 3 “Nanobioparticule inteligente concepute pentru vectorizarea compușilor bioactivi pentru terapia inflamației vasculare”: Dr. Manuela Călin.
3. **PNRR-III-C9-2022-I8-CF93** – „Noi strategii nanoterapeutice care țintesc mecanismele implicate în tranziția fibroblast-miofibroblast pentru tratamentul fibrozei cardiace (HeartCure)”, director de proiect Dr. Rostyslav Billy, responsabil științific instituția gazdă Dr. Manuela Călin
4. **ERANET-NANOTECMEC-Ctr. nr. 92/2025** – „Nanovehicule pentru transportul Ago/antagomiR utilizate pentru imunoreglare: o posibilă abordare în tratamentul cancerului și transplantului pulmonar (SAIL)”, director de proiect Dr. Rostyslav Billy.
5. **H2020-EU.1.2.-AMD-861878-17 (2025)** – „Dezvoltarea unor amplificatori „inteligenți” ai speciilor reactive de oxigen, specifici pentru neutrofilele polimorfonucleare aberante, pentru tratamentul bolilor inflamatoare și autoimune, al cancerului și al mieloablației. (NeutroCure)”, director de proiect Prof. Dr. Andriy Mokhir.

ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Studiul rolului hypoxamiR-210 în răspunsul inflamator pe modele de șoareci transgenici pentru identificarea unor ținte comune în hipoxie și inflamație

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

Dr. CS I ALEXANDRINA BURLACU

DOCTORAND:

CARMEN-ALEXANDRA NECULACHI

2026

Cuprins

Cuprins 1

Lista de abrevieri 7

Introducere 11

I. Stadiul actual al cunoașterii 14

1. Hipoxia și rolul ei ca mediator al răspunsului inflamator 15

1.1 Factorul de transcriere HIF ca mediator central în adaptarea la hipoxie 15

1.2 Componente celulare implicate în modularea inflamației 20

1.3 Interacțiunea dintre hipoxie și inflamație: rolul central al macrofagelor 36

2. ARN-ul necodant și rolul lui în controlul funcțiilor celulare 44

2.1 Clasificarea ARN-urilor necodante 44

2.2 miR-urile: caracteristici generale și biogeneză 46

2.3 Mecanisme de acțiune ale miR-urilor 53

2.4 miR-urile ca reglatori ai răspunsului inflamator 55

3. miR-210 la interfața dintre hipoxie și inflamație 58

3.1 miR-210 ca reglator molecular al adaptării celulare la hipoxie 58

3.2 miR-210 ca mediator al răspunsului la hipoxie în context inflamator 66

II. Contribuții originale 70

1. Caracterizarea modelelor murine transgenice pentru studiul miR-210 71

1.1 Introducere și obiective 71

1.2 Materiale și metode 73

1.3 Caracterizarea șoarecilor cu deleție de miR-210 77

1.4 Caracterizarea șoarecilor cu supraexpresie condiționată a miR-210 81

1.5 Discuții 88

1.6 Limitări și perspective 89

2. Modificări transcriptomice și funcționale în fibroblaste cu deleție de miR-210 90

2.1 Introducere și obiective 90

2.2 Materiale și metode 91

2.3 Rezultate **96**
2.4 Discuții **108**
2.5 Concluzii parțiale **109**
2.6 Limitări și perspective **110**
3. Comportamentul celulelor stromale mezenchimale în inflamație și hipoxie **111**
3.1 Introducere și obiective **111**
3.2 Materiale și metode **112**
3.3 Rezultate **115**
3.4 Discuții **126**
3.5 Concluzii parțiale **127**
3.6 Limitări și perspective **128**
4. Rolul miR-210 în modularea funcției macrofagelor în inflamație **129**
4.1 Introducere **129**
4.2 Materiale și metode **130**
4.3 Rezultate **142**
4.4 Discuții **163**
4.5 Concluzii parțiale **164**
4.6 Limitări și perspective **165**
5. Impactul deleției miR-210 asupra transcriptomului în celulele HEK293T **166**
5.1 Introducere și obiective **166**
5.2 Materiale și metode **167**
5.3 Rezultate **175**
5.4 Discuții **186**
Concluzii generale **190**
Bibliografie **192**

I. Rezumat

Cuvinte cheie: miR-210, macrofage, fibroblaste, HEK, celule stem mezenchimale, inflamație, hipoxie.

Număr total de pagini – 211

Număr de figuri în Partea I – 22

Număr de tabele în Partea I – 1

Număr de figuri în Partea II – 74

Număr de tabele în Partea II –8

Referințe bibliografice – 244

Lucrări publicate în reviste indexate ISI în perioada stagiului de doctorat – 8 (1 autor principal)

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale – 3 (autor principal)

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – 1 (autor principal)

Burse obținute pe durata programului doctoral – 2

Participarea în proiecte de cercetare – 3

II. Introducere și Obiective

Acizii ribonucleici necodanți (ARNnc) reprezintă componente esențiale ale arhitecturii de reglare genomică, participând la controlul expresiei genice la nivel epigenetic, transcripțional și post-transcripțional (Esteller, 2011; Statello și colab., 2021). MicroARN-urile (miR) constituie o subclasă de ARNnc de mici dimensiuni (≈21–23 nucleotide), care reglează expresia genică post-transcripțional prin interacțiunea cu regiunea 3′UTR a ARN-urilor mesagere țintă, conducând la reprimarea translației și/sau degradarea transcriptului (Bartel, 2009; He și Hannon, 2004). Prin complementaritate parțială, un singur miR poate modula simultan expresia mai multor transcripți, contribuind la reglarea fină a programelor de expresie genică.

Hipoxia reprezintă o condiție de stres cu relevanță fiziopatologică majoră, prezentă în inflamația acută și cronică, ischemia tisulară și patologia cardiovasculară (Eltzschig și Carmeliet, 2011; Colgan și colab., 2020). Răspunsul celular la reducerea disponibilității oxigenului este coordonat de factorii inductibili de hipoxie (HIF), care modulează expresia genelor implicate în metabolismul energetic, angiogeneză și supraviețuire celulară (Semenza, 2012; Bakleh și Al Haj Zen, 2025). Stabilizarea HIF (Epstein și colab., 2001; Bruick și McKnight, 2001) declanșează un program transcripțional adaptativ caracterizat prin reprogramare metabolică și ajustarea funcției mitocondriale.

În acest context, miR-210 a fost identificat drept un reglator central al răspunsului celular la hipoxie, fiind direct controlat de HIF prin legarea la elemente de răspuns la hipoxie (HRE) conservate evolutiv (Chan și colab., 2012; Semenza, 2012). Funcțional, miR-210 modulează expresia genelor implicate în metabolismul mitocondrial, angiogeneză, repararea ADN și reglarea ciclului celular, contribuind la integrarea adaptării metabolice cu mecanismele de supraviețuire celulară în condiții de hipoxie (Chan și colab., 2009; Devlin și colab., 2011; He și colab., 2012). Organizarea genomică a locusului miR-210, localizat intronic în cadrul genei MIR210HG, sugerează o posibilă interdependență funcțională între miR-210 și contextul său genomic.

Majoritatea studiilor disponibile au utilizat modele de supraexpresie sau inhibiție tranzitorie, fără a evalua sistematic consecințele deleției genomice complete a locusului miR-210. Această limitare este relevantă în contextul organizării tridimensionale a genomului și al existenței domeniilor de asociere topologică (TAD), unde perturbarea unui locus genomic poate genera efecte transcriptomice extinse dincolo de secvența țintită (Dixon și colab., 2012; Nora și colab., 2012; Engreitz și colab., 2016).

Pe baza acestor considerente, în această teză ne-am propus să investigăm legătura dintre semnalizarea indusă de hipoxie și inflamație, evaluând în mod specific rolul locusului genomic al lui miR-210 în contexte inflamatorii relevante. Teza de doctorat pornește de la **ipoteza** conform căreia deleția genomică a locusului miR-210 determină perturbări ale rețelelor transcriptomice implicate în adaptarea celulară la hipoxie, prin mecanisme care ar putea reflecta atât absența miR-210 matur, cât și perturbarea contextului genomic local asociat locusului

MIR210HG.. În acest context, **scopul principal** al tezei a fost, pe de o parte, investigarea consecințelor funcționale și transcriptomice ale deleției lui miR-210 la nivel celular, iar pe de alta parte, investigarea consecințelor manipulării locusului miR-210 asupra stabilității genomice. Pentru atingerea acestui scop au fost stabilite următoarele **obiective specifice**: (i) caracterizarea șoarecilor transgenici (șoareci cu deleție constitutivă a miR-210 și șoareci cu supraexpresie inductibilă de miR-210); (ii) obținerea și validarea modelelor celulare cu deleție a locusului miR-210; (iii) evaluarea comparativă a răspunsului transcriptomic în celulele WT și miR-210 KO; (iv) identificarea genelor și căilor biologice modificate în urma deleției miR-210 sau a locusului MIR210HG; (v) analiza impactului deleției asupra efectelor funcționale ale pierderii locusului miR-210.

Noutatea acestei teze constă în analiza sistematică a efectelor deleției genomice complete a locusului miR-210 în condiții de normixie și hipoxie, într-un cadru experimental care permite distingerea între consecințele pierderii miR-ului matur și posibilele efecte asociate perturbării contextului genomic local (MIR210HG). Teza demonstrează că locusul miR-210 funcționează în interacțiune cu elementele genetice adiacente și subliniază importanța luării în considerare a localizării genomice și a caracteristicilor structurale ale fiecărui locus de ARN necodant în experimentele de pierdere a funcției realizate prin tehnologii de editare genomică.

În plus, evaluarea acestor efecte în celule primare relevante fiziologic (fibroblaste, macrofage, HEK), consolidează relevanța biologică a observațiilor și oferă un cadru interpretativ robust pentru modificările transcriptomice identificate. Prin integrarea modelelor murine transgenice, a celulelor primare și a liniilor celulare modificate genetic, teza propune o perspectivă unitară asupra rolului miR-210 la interfața dintre hipoxie și inflamație.

III. Structura tezei

Teza de doctorat este structurată în două părți majore:

Partea I – Stadiul actual al cunoașterii cuprinde o analiză a literaturii de specialitate privind rolul hipoxiei în reglarea răspunsului celular, interacțiunea funcțională dintre hipoxie și inflamație, precum și mecanismele de reglare post-transcripțională mediate de ARN-uri necodante, cu accent pe microARN-uri și, în mod particular, pe miR-210. Această parte este

structurată în trei capitole principale, care oferă cadrul teoretic necesar pentru dezvoltarea direcțiilor experimentale ale tezei. În **capitolul 1**, sunt prezentate mecanismele moleculare prin care hipoxia modulează răspunsul inflamator, cu accent pe rolul factorilor inductibili de hipoxie și pe interacțiunea acestora cu căile de semnalizare inflamatorii. Sunt analizate mai multe tipuri celulare implicate în inflamație, inclusiv macrofagele, fibroblastele și celulele stromale mezenchimale, precum și modul în care acestea răspund la stresul hipoxic (Davidson și colab., 2021; Bernardo și Fibbe, 2013). Capitolul evidențiază faptul că hipoxia și inflamația reprezintă procese biologice interdependente, care se influențează reciproc prin mecanisme moleculare și celulare comune. **Capitolul 2**, prezintă mecanismele generale de reglare post-transcripțională mediate de ARNnc, cu accent pe clasificarea acestora și pe rolul microARN-urilor în controlul expresiei genice. Sunt descrise procesele de biogeneză ale microARN-urilor (Bartel, 2004), mecanismele de acțiune și impactul acestora asupra rețelelor transcriptomice, subliniindu-se rolul lor în reglarea fină a proceselor biologice, inclusiv în contexte de stres celular precum hipoxia și inflamația. **Capitolul 3**, este dedicat analizei miR-210, considerat un reglator central al răspunsului la hipoxie. Sunt prezentate mecanismele de reglare a expresiei miR-210 de către HIF, organizarea genomică a locusului MIR210HG și funcțiile acestuia în controlul proceselor celulare, inclusiv metabolismul mitocondrial, angiogeneză, stabilitate genomică și reglarea răspunsului imun. Capitolul evidențiază rolul miR-210 ca element integrator al semnalizării hipoxice și inflamatorii. Prin integrarea acestor capitole, este conturat un cadru conceptual în care miR-210 este poziționat la interfața dintre hipoxie și inflamație, constituind un potențial reglator cheie al adaptării celulare la stres.

Partea a II-a – Contribuții originale este dedicată studiilor experimentale realizate pentru investigarea rolului miR-210 și al locusului său genomic în reglarea răspunsului celular la hipoxie și inflamație, utilizând modele murine transgenice și multiple tipuri celulare relevante fiziologic. **Capitolul 1** este dedicat caracterizării modelelor murine transgenice utilizate în studii. Șoarecii au fost obținuți de la colaboratorii noștri, modelul miR-210 OE de la Prof. Dr. Fabio Martelli (Policlinico San Donato, Italia), iar modelul miR-210 KO de la Prof. Dr. Mircea Ivan (Indiana University, SUA). Sunt prezentate strategiile de generare a modelelor animale (deleția constitutivă, respectiv supraexpresia inductibilă a miR-210) și metodele caracterizare și validarea moleculară a celor două linii. Acest capitol stabilește cadrul experimental necesar

pentru investigarea consecințelor pierderii sau supraexpresiei miR-210 *in vivo* și *ex vivo*. **Capitolul 2** analizează rolul miR-210 în fibroblaste, cu accent pe modificările transcriptomice și funcționale asociate deleției acestuia. Sunt investigate răspunsurile celulare în condiții de normoxie și hipoxie, evidențiindu-se impactul asupra proceselor de proliferare și adaptare metabolică. **Capitolul 3** analizează comportamentul celulelor stromale mezenchimale în condiții de inflamație și hipoxie, cu accent pe supraviețuire, proliferare și activarea programelor imunomodulatoare. Sunt evaluate efectele stimulilor proinflamatori asupra viabilității celulare, expresiei genelor implicate în funcția imunomodulatoare și producției de oxid nitric. De asemenea, este investigat impactul asocierii dintre inflamație și hipoxie asupra supraviețuirii MSC, evidențiindu-se faptul că acest microambient afectează negativ homeostazia și funcția acestor celule. **Capitolul 4** investighează rolul miR-210 în macrofage, cu accent pe polarizarea acestora și pe reglarea răspunsului inflamator. Sunt analizate macrofagele miR-210 KO, evidențiindu-se alterarea polarizării anti-inflamatorii și favorizarea unui fenotip pro-inflamator în absența miR-210. **Capitolul 5** este dedicat studiului rolului locusului genomic miR-210 în linii celulare umane (HEK293T) modificate prin editare genomică. Sunt analizate consecințele deleției asupra expresiei genice și asupra proceselor celulare, inclusiv proliferare, organizarea fusului mitotic și stabilitatea genomică. Rezultatele sugerează că efectele observate nu sunt limitate la absența miR-210 matur, ci reflectă și perturbarea contextului genomic al locusului MIR210HG.

Astfel, structura acestei părți reflectă o abordare progresivă, de la validarea modelelor experimentale până la analiza funcțională și transcriptomică în diferite tipuri celulare. Integrarea rezultatelor obținute evidențiază faptul că miR-210 acționează ca un reglator al adaptării celulare la hipoxie și al răspunsului inflamator, iar efectele deleției sale nu pot fi atribuite exclusiv pierderii miR-ului matur, ci includ și consecințe asociate perturbării contextului genomic al locusului MIR210HG.

IV. Principalele rezultate

Capitolul 1. Caracterizarea modelelor murine transgenice pentru studiul miR-210

Un prim rezultat important al tezei a fost reprezentat de validarea și caracterizarea celor două modele murine transgenice utilizate pentru studiul funcției miR-210: modelul cu deleție constitutivă a miR-210 (miR-210 KO) și modelul cu supraexpresie inductibilă a miR-210 (miR-210 OE). În cazul modelului miR-210 KO, genotiparea a permis diferențierea clară a animalelor WT, heterozigote și homozigote, pe baza produșilor de PCR obținuți; iar absența expresiei miR-210 a fost confirmată prin RT-qPCR atât în ventriculul stâng, cât și în macrofagele derivate din măduva osoasă.

În paralel, modelul miR-210 OE a permis inducerea controlată a expresiei miR-210 prin sistemul Tet-On, cu integrarea transgenei în locusul ROSA26. Administrarea de doxiciclină a determinat creșterea semnificativă a expresiei miR-210 în inimă și mușchi scheletic, într-o manieră dependentă de doză, confirmând funcționalitatea modelului *in vivo*. Totuși, studiile efectuate pe celule izolate de la aceste animale au evidențiat caracterul tranzitoriu al supraexpresiei și imposibilitatea reactivării eficiente a sistemului Tet-On în cultură, sugerând existența unor constrângeri specifice mediului *in vivo*. În ansamblu, acest capitol a furnizat modelele experimentale și metodologia necesare pentru evaluarea rolului miR-210 în diferite tipuri celulare și contexte biologice.

Capitolul 2. Modificări transcriptomice și funcționale în fibroblaste cu deleție de miR-210

În acest capitol a fost studiat impactul deleției miR-210 asupra metabolismului și funcției fibroblastelor, utilizând fibroblaste dermice murine izolate de la șoarecii transgenici. Validarea deleției a demonstrat absența completă a expresiei miR-210 în fibroblastele KO, atât în normoxie, cât și în hipoxie, în timp ce fibroblastele WT au prezentat inducție pronunțată a miR-210 în condiții hipoxice. Analiza transcriptomică comparativă a fibroblastelelor miR-210 KO a evidențiat modificări semnificative în căile biologice asociate fosforilării oxidative, glicolizei, metabolismului acizilor grași, semnalizării mTORC1 și răspunsului la hipoxie, susținând rolul miR-210 în integrarea adaptării metabolice la stresul hipoxic.

Un rezultat notabil a fost identificarea unor modificări de expresie la nivelul genelor situate în proximitatea genomică a locusului miR-210, inclusiv Rassf7, Rnh1, Taldo1 și Cd151, ceea ce sugerează că deleția acestui locus poate afecta nu doar funcția microARN-ului matur, ci și reglarea transcripțională locală în cadrul domeniului genomic care îl conține. Din punct de vedere funcțional, fibroblastele miR-210 KO au prezentat o reducere semnificativă a capacității respiratorii maxime și a rezervei respiratorii mitocondriale (Figura 1a), precum și o creștere a ROS mitocondriale în hipoxie. În plus, analiza ciclului celular a evidențiat o redistribuire a celulelor între fazele ciclului celular, caracterizată prin acumularea în faza S și reducerea proporției de celule aflate în faza G0/G1, sugerând o dereglare a tranziției G1/S și o perturbare a progresiei ciclului celular, asociată cu o diminuare a ratei de proliferare celulară (Figura 1b). Aceste date demonstrează că miR-210 contribuie la menținerea homeostaziei mitocondriale, a echilibrului redox și a progresiei corecte a ciclului celular în fibroblaste, în special în condiții de stres hipoxic.

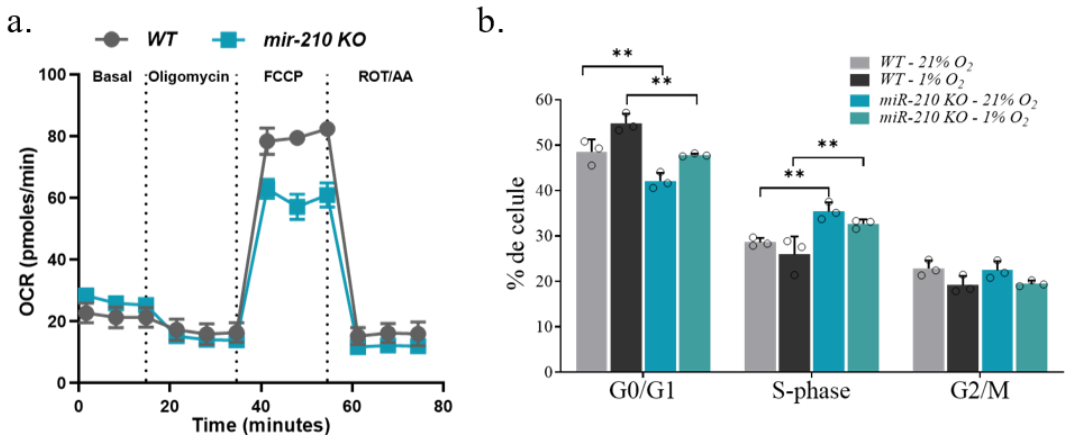


Figura 1. *Profilul OCR în fibroblastele WT și miR-210 KO și analiza ciclului celular în fibroblaste WT și miR-210 KO în normoxie (21% O_2) și hipoxie (1% O_2). (a) Reprezentarea temporală a dinamicii OCR măsurată prin testul Seahorse Mito Stress în condiții bazale și după adăugarea inhibitorilor. (b) Reprezentarea cantitativă a procentului celulelor aflate în fazele G0/G1, S și G2/M. Datele sunt exprimate ca medie ± SD. Analiza statistică: two-way ANOVA; **p < 0.01. (Figură adaptată după Preda și colab., 2025)*

Capitolul 3. Comportamentul celulelor stromale mezenchimale în inflamație și hipoxie

Acest capitol a urmărit modul în care microambientul inflamator și hipoxic influențează fenotipul și supraviețuirea celulelor stromale mezenchimale (MSC), având în vedere rolul lor central în reglarea inflamației și regenerarea tisulară. Rezultatele au arătat că stimularea inflamatorie activează programele imunomodulatoare ale MSC, evidențiate prin creșterea expresiei genelor IDO1, NOS2 și COX2. În același timp, TNF-α a inhibat proliferarea într-o manieră dependentă de doză, iar asocierea TNF-α și IFN-γ a amplificat acest efect, inducând modificări morfologice compatibile cu stresul celular și moartea celulară.

Un rezultat important a fost demonstrarea faptului că activarea inflamatorie a MSC este însoțită de o creștere semnificativă a producției de oxid nitric, iar inhibarea NOS2 a ameliorat parțial viabilitatea celulară, sugerând implicarea excesului de NO în citotoxicitatea observată. În condiții de hipoxie moderată, MSC și-au menținut inițial viabilitatea, însă asocierea hipoxiei cu stimulii inflamatori a determinat o reducere accentuată a supraviețuirii celulare. În ansamblu, datele obținute arată că interacțiunea dintre inflamație și hipoxie compromite funcția și viabilitatea MSC, prin activarea excesivă a căilor dependente de NOS2 și prin perturbarea homeostaziei redox. Aceste rezultate subliniază importanța optimizării condițiilor de precondiționare și cultură pentru utilizarea terapeutică a MSC în contexte inflamatorii și hipoxice.

Capitolul 4. Rolul miR-210 în modularea funcției macrofagelor în inflamație

În acest capitol a fost analizat rolul miR-210 în reglarea funcției macrofagelor derivate din măduva osoasă, cu accent pe polarizarea funcțională, profilul metabolic și răspunsul inflamator. Monocitele izolate din măduva osoasă au fost diferențiate în macrofage M0 și polarizate ulterior către fenotipul M2. Analizele efectuate au arătat că macrofagele provenite de la șoarecii miR-210 KO prezintă un profil inflamator accentuat în starea bazală și o tranziție deficitară către fenotipul M2. Analiza transcriptomică a indicat modificări semnificative ale expresiei genice atât în macrofagele M0, cât și în cele M2, iar analizele bioinformatice au evidențiat activarea căilor implicate în răspunsul la stres oxidativ, hipoxie și inflamație, concomitent cu reducerea expresiei genelor asociate răspunsului dependent de interferon și semnalizării IL-6/STAT3 (Figura 2 a,b).

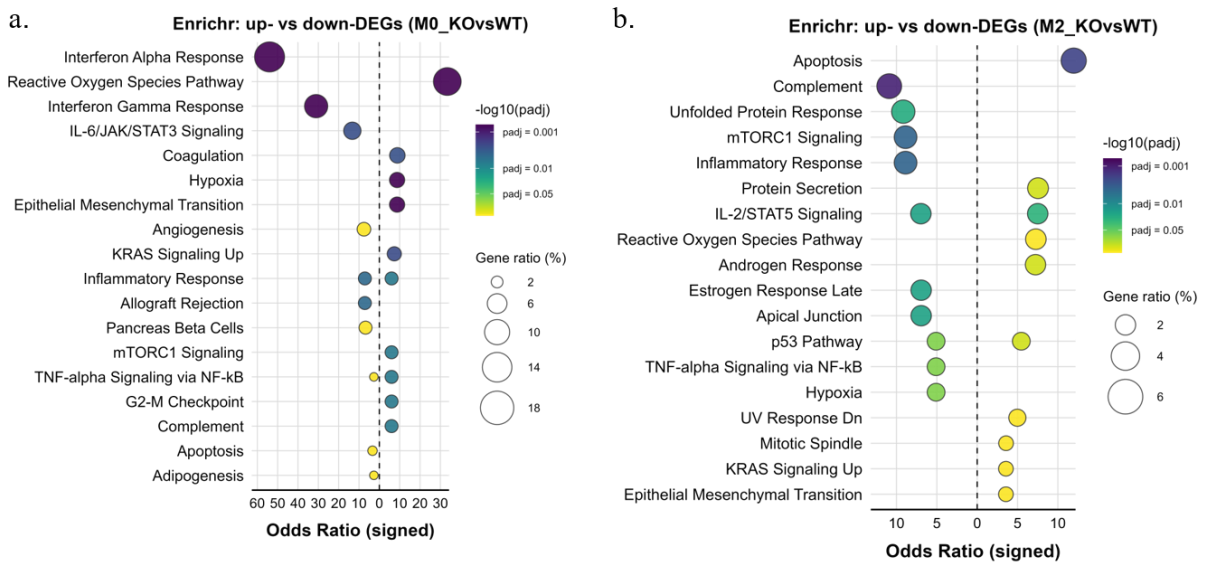


Figura 2. *Efectele deleției miR-210 în macrofagele M0 și M2. Reprezentări dot-plot obținute cu platforma Enrichr, care evidențiază căile biologice semnificativ îmbogățite în rândul genelor diferențial exprimate (DEG) între macrofagele provenite de la șoarecii miR-210 KO și cele WT: (a) în macrofagele de tip M0 și (b) în macrofagele de tip M2 (adaptat după Neculachi și colab., 2025).*

Aceste rezultate au fost confirmate funcțional prin creșterea secreției de IL-6, TNF-α și IL-1β în macrofagele M0 miR-210 KO și prin acumularea precursorului pro-IL-1β, indicând o activare inflamatorie intrinsecă în absența acestui microARN. În condiții de polarizare M2, macrofagele KO au prezentat o reprogramare incompletă, cu reducerea markerilor M2, activarea căilor proapoptotice și susceptibilitate crescută la apoptoză după stimularea cu TNF-α. De asemenea, a fost evidențiată creșterea nivelurilor proteinelor p53, TGF-β și MMP-9, sugerând activarea unor programe asociate stresului celular și remodelării tisulare. Analiza metabolică a arătat că macrofagele M0 KO au o activitate glicolitică bazală redusă, iar testele funcționale au demonstrat o activitate fagocitară și eferocitară crescută (Figura 3 a,b). În ansamblu, rezultatele demonstrează că miR-210 acționează ca un regulator integrator al metabolismului și inflamației în macrofage, contribuind la menținerea echilibrului dintre activarea inflamatorie, supraviețuire și polarizarea alternativă.

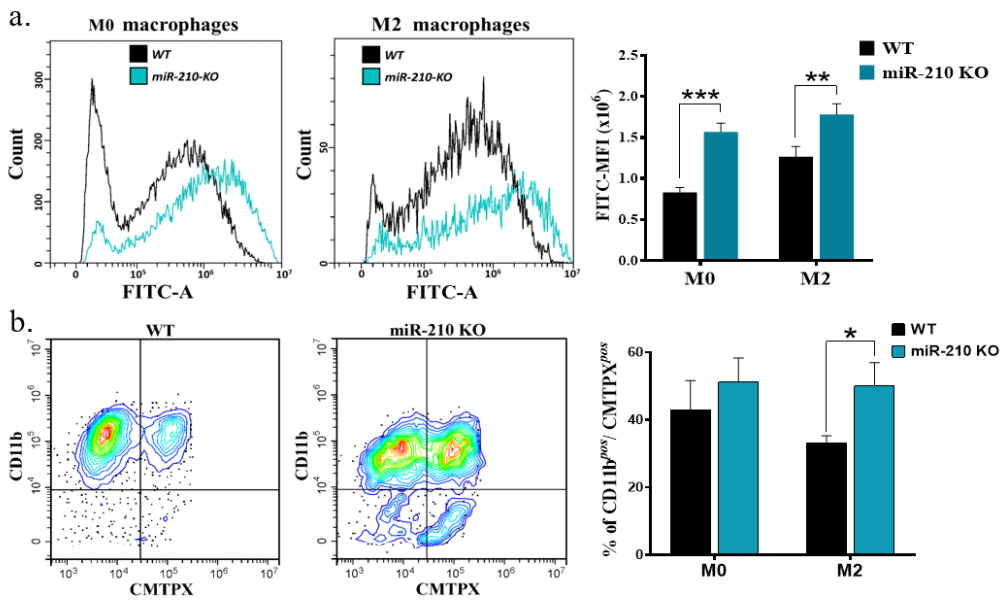


Figura 3. *Caracterizarea funcțională a macrofagelor miR-210 KO. (a) Capacitatea fagocitară a macrofagelor M0 și M2 (citometrie în flux), cuantificată ca FITC-MFI (n = 6/condiție). (b) Capacitatea de eferocitoză a macrofagelor WT și miR-210 KO, cuantificată ca procent de celule CD11b⁺CMTPX⁺ în condițiile M0 și M2 (n=3/condiție). Datele sunt exprimate ca medie ± SEM. Analiza statistică: two-way ANOVA, **p < 0,01, ***p < 0,001 (adaptat după Neculachi și colab., 2025).*

Capitolul 5. Impactul deleției miR-210 asupra transcriptomului în celulele HEK293T

Pentru evaluarea rolului locusului miR-210 într-un context genomic uman, a fost dezvoltat un model experimental bazat pe celulele HEK293T, în care au fost generate două tipuri de clone knockout: clone cu deleția secvenței pre-miR-210 și clone cu deleția extinsă a locusului MIR210HG. Validarea moleculară a confirmat absența expresiei miR-210 și a transcriptului gazdă MIR210HG în hipoxie. Analiza transcriptomică prin RNA-seq a evidențiat modificări consistente ale expresiei genice în celulele knockout, afectând în special căi implicate în adaptarea la hipoxie, reglarea ciclului celular, semnalizarea mTORC1, răspunsul la stres celular, activarea NF-κB și răspunsul la stres proteotoxic. Aceste rezultate arată că deleția locusului miR-210 perturbă programele de adaptare celulară la hipoxie și afectează mecanismele de control al proliferării.

Un rezultat notabil al acestui capitol a fost demonstrarea existenței unui efect local, de tip cis, asupra expresiei genelor situate în vecinătatea locusului MIR210HG. Gene localizate într-un interval de aproximativ 400–500 kb în jurul locusului au prezentat modificări de expresie, iar analiza interacțiunilor cromatiniene, utilizând date Hi-C publice, a sugerat integrarea regiunii într-un domeniu topologic asociat (TAD). Aceste date susțin ipoteza că deleția locusului miR-210 poate altera arhitectura locală a cromatinei și interacțiunile cis-reglatoare din regiune. Testele funcționale au arătat că deleția locusului miR-210 reduce capacitatea proliferativă și afectează respirația mitocondrială, iar analiza ciclului celular a indicat o întârziere a tranziției G1/S în hipoxie.

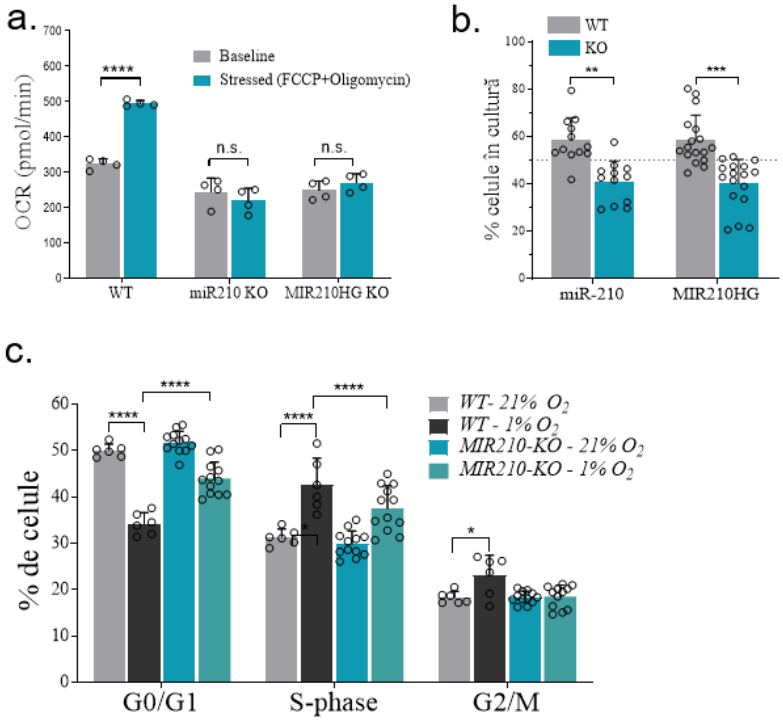


Figura 4. *Consecințele funcționale ale deleției locusului miR-210 în celulele HEK293T. (a) Modificările OCR în clonele HEK, măsurate în condiții bazale și de stres. (b) Teste de proliferare competitivă între clonele WT marcate cu GFP și miR210-KO sau MIR210HG-KO marcate cu dTomato, analizate după 3 zile de co-cultură. (c) Analiza distribuției ciclului celular în celulele HEK cultivate în condiții de normoxie și hipoxie. Analiza statistică a fost realizată utilizând testul two-way ANOVA, iar semnificația statistică este reprezentată astfel: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001, (Figură adaptată după Preda, M.B.,2025).*

În ansamblu, aceste rezultate demonstrează că fenotipul asociat deleției locusului miR-210 nu poate fi explicat exclusiv prin pierderea miR-210 matur, ci reflectă și perturbarea unei unități genomice integrate, care include transcriptul gazdă MIR210HG și elemente locale de reglare.

V. Concluzii generale

Rezultatele acestei teze arată faptul că miR-210 funcționează ca un reglator integrator la interfața dintre hipoxie și inflamație. Atât în fibroblaste, cât și în celulele umane HEK293T, deleția miR-210 / a locusului său determină o dereglare comună a adaptării celulare la hipoxie: perturbarea programelor metabolice și a funcției mitocondriale (reducerea capacității respiratorii), alterarea progresiei ciclului celular la nivelul tranziției G1/S și afectarea programelor transcripționale de răspuns la hipoxie. În plus, în ambele modele deleția produce un efect local, de tip cis: sunt modificate gene învecinate locusului (Rassf7, Rnh1, Taldo1, Cd151), integrate într-un domeniu topologic asociat (TAD) — ceea ce arată că locusul miR-210/MIR210HG se comportă ca o unitate genomică integrată, fenotipul deleției neputând fi explicat exclusiv prin pierderea microARN-ului matur. În macrofage, miR-210 menține echilibrul dintre activarea inflamatorie și polarizarea reparatorie: absența sa determină un fenotip proinflamator bazal (IL-6, TNF-α, IL-1β) și o reprogramare M2 incompletă, însoțită de activarea programelor de stres celular (p53, TGF-β, MMP-9), poziționând miR-210 ca reglator integrator al metabolismului și al răspunsului inflamator. În ansamblu, consecințele funcționale ale pierderii miR-210 reflectă atât absența miR-ului matur, cât și perturbarea arhitecturii cromatiniene locale.

VI. Contribuțiile originale ale tezei

1. Caracterizarea și validarea moleculară a două modele murine transgenice complementare pentru studiul funcțional al miR-210 — deleție constitutivă (KO) și supraexpresie inductibilă Tet-On/ROSA26 (OE), prin genotipare și RT-qPCR în țesuturi și în celule primare derivate.

2. Demonstrarea inducției dependente de doză a miR-210 *in vivo* în modelul OE și a caracterului tranzitoriu al supraexpresiei în cultură.

3. Identificarea, în fibroblastele cu deleție de miR-210, a unei semnături transcriptomice de dereglare metabolică (fosforilare oxidativă, glicoliză, metabolismul acizilor grași, semnalizare mTORC1 și răspuns la hipoxie).

4. Demonstrarea reducerii capacității respiratorii maxime și a rezervei respiratorii mitocondriale, însoțită de creșterea ROS mitocondriale în hipoxie, în fibroblastele miR-210 KO.

5. Demonstrarea perturbării ciclului celular în fibroblastele KO (acumulare în faza S, reducerea fracției G0/G1 și dereglarea tranziției G1/S), cu diminuarea ratei de proliferare.

6. Identificarea unui efect local al deleției asupra genelor învecinate locusului miR-210 (Rassf7, Rnh1, Taldo1, Cd151), indicând perturbarea reglării transcripționale din domeniul genomic care îl conține.

7. Demonstrarea unui fenotip proinflamator bazal accentuat în macrofagele M0 miR-210 KO (creșterea secreției de IL-6, TNF-α și IL-1β și acumularea precursorului pro-IL-1β).

8. Demonstrarea reprogramării deficitare către fenotipul M2 a macrofagelor KO (reducerea markerilor M2, susceptibilitate crescută la apoptoză după TNF-α și creșterea p53, TGF-β și MMP-9).

9. Demonstrarea unei activități glicolitice bazale reduse și a unei capacități fagocitare și eferocitare crescute la macrofagele miR-210 KO, poziționând miR-210 ca reglator integrator al metabolismului și inflamației.

10. Dezvoltarea unui model celular uman (HEK293T) cu deleția fie a secvenței pre-miR-210, fie a întregului locus MIR210HG, prin editare genomică.

11. Demonstrarea, prin RNA-seq, a perturbării programelor de adaptare la hipoxie, reglare a ciclului celular, semnalizare mTORC1 și NF-κB și răspuns la stres proteotoxic în clonele HEK293T KO.

12. Identificarea unui efect cis asupra expresiei genelor situate la ~400–500 kb de locus și, prin integrarea datelor Hi-C, plasarea regiunii într-un domeniu topologic asociat (TAD),

susținând conceptul că locusul miR-210/MIR210HG funcționează ca o unitate genomică integrată.

VII. Bibliografie selectivă

1. Bakleh, M. Z. și Al Haj Zen, A. (2025). The Distinct Role of HIF-1α and HIF-2α in Hypoxia and Angiogenesis. Cells, 14.
2. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. Cell, 116, 281–297.
3. Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell, 136, 215–233.
4. Bernardo, M. E. și Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: Sensors and switchers of inflammation. Cell Stem Cell, 13, 392–402.
5. Bruick, R. K. și McKnight, S. L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. Science, 294, 1337–1340.
6. Chan, S. Y., Zhang, Y. Y., Hemann, C., și colab. (2009). MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing ISCU1/2. Cell Metabolism, 10, 273–284.
7. Chan, Y. C., Banerjee, J., Choi, S. Y., și colab. (2012). miR-210: The Master Hypoxamir. Microcirculation, 19, 215–223.
8. Colgan, S. P., Furuta, G. T. și Taylor, C. T. (2020). Hypoxia and Innate Immunity. Annual Review of Immunology, 38, 341–363.
9. Davidson, S., Coles, M., Thomas, T., și colab. (2021). Fibroblasts as immune regulators in infection, inflammation and cancer. Nature Reviews Immunology, 21, 704–717.
10. Devlin, C., Greco, S., Martelli, F., și colab. (2011). miR-210: More than a silent player in hypoxia. IUBMB Life, 63, 94–100.
11. Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., și colab. (2012). Topological Domains in Mammalian Genomes Identified by Analysis of Chromatin Interactions. Nature, 485, 376.

12. Eltzschig, H. K. și Carmeliet, P. (2011). Hypoxia and Inflammation. New England Journal of Medicine, 364, 656.

13. Engreitz, J. M., Haines, J. E., Perez, E. M., și colab. (2016). Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. Nature, 539, 452–455.

14. Epstein, A. C. R., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., și colab. (2001). EGL-9 and homologs regulate HIF by prolyl hydroxylation. Cell, 107, 43–54.

15. Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. Nature Reviews Genetics, 12, 861–874.

16. He, J., Wu, J., Xu, N., și colab. (2012). MiR-210 disturbs mitotic progression. Nucleic Acids Research, 41, 498.

17. He, L. și Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role. Nature Reviews Genetics, 5, 522–531.

18. Neculachi, C. A., Nastase-Rusu, E. G., Cherry, L., și colab. (2025). miR-210 promotes the anti-inflammatory phenotype and M2 polarization in murine macrophages. Frontiers in Immunology, 16.

19. Nora, E. P., Lajoie, B. R., Schulz, E. G., și colab. (2012). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. Nature, 485, 381–385.

20. Preda, M. B., Nastase-Rusu, E. G., Neculachi, C. A., și colab. (2025). miR-210 locus deletion disrupts cellular homeostasis: an integrated genetic study. Scientific Reports, 15, 22659.

21. Semenza, G. L. (2012). Hypoxia inducible factors in physiology and medicine. Cell, 148, 399–408.

22. Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L., și colab. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 22, 96–118.

VIII. EFICIENȚA ȘI DISEMINAREA CERCETĂRILOR

LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE COTATE ISI CA AUTOR PRINCIPAL

1. Neculachi CA, Nastase-Rusu EG, Cherry L, Marinescu-Colan CI, Tastsoglou S, Cosman BP, Popa AM, Panciuc C, Zaccagnini G, Catrina SB, Simionescu M, Martelli F, Preda MB, Burlacu A. miR-210 promotes the anti-inflammatory phenotype and M2 polarization in murine macrophages. Front Immunol. 2025;16:1633163. doi: 10.3389/fimmu.2025.1633163. IF 2024: 5.9 (Q1).

LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE BDI CA AUTOR PRINCIPAL

1. Neculachi CA*, Leti LI*, Burlacu A, Preda MB. Inflammation and Hypoxia Negatively Impact the Survival and Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stromal Cells In Vitro. Rom J Cardiol. 2021;31(3):547–554. doi: 10.47803/rjc.2021.31.3.547. (*contribuții egale).

LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE ISI ÎN CALITATE DE CO-AUTOR

1. Cherry L, Popescu S, Neculachi CA, Nastase-Rusu EG, Marinescu-Colan CI, Cosman BP, Ciortan L, Martelli F, Simionescu M, Butoi E, Burlacu A, Preda MB. Mesenchymal stromal cells modulate neutrophil phenotype via paracrine signals. Stem Cell Res Ther. 2025;16(1):574. doi: 10.1186/s13287-025-04684-w. IF 2024: 7.3 (Q1).

2. Preda MB, Nastase-Rusu EG, Neculachi CA, Zhong X, Voellenkle C, Mazure NM, Balacescu O, Ivan C, Zheng XW, Gherghiceanu M, Lebrigand K, Simionescu M, Martelli F, Mari B, Catrina SB, Burlacu A, Ivan M. miR-210 locus deletion disrupts cellular homeostasis: an integrated genetic study. Sci Rep. 2025;15(1):22659. doi: 10.1038/s41598-025-07572-8. IF 2024: 3.9 (Q1).

3. Marinescu-Colan CI, Nastase-Rusu EG, Neculachi CA, Martelli F, Cherry L, Preda MB, Burlacu A. From cancer to heart fibrosis – GLIPR1 highlights a subset of myofibroblasts responsive to mesenchymal stem cell therapy after myocardial infarction. Biomed Pharmacother. 2025;187:118087. doi: 10.1016/j.biopha.2025.118087. IF 2024: 7.5 (Q1).

4. Rusu-Nastase EG, Lupan AM, Marinescu CI, Neculachi CA, Preda MB, Burlacu A. MiR-29a increase in aging may function as a compensatory mechanism against cardiac fibrosis through SERPINH1 downregulation. Front Cardiovasc Med. 2022;8:810241. doi: 10.3389/fcvm.2021.810241. IF 2022: 3.6 (Q2).

5. Preda MB, Neculachi CA, Fenyo IM, Vacaru AM, Publik MA, Simionescu M, Burlacu A. Short lifespan of syngeneic transplanted MSC is a consequence of in vivo apoptosis and immune cell recruitment in mice. Cell Death Dis. 2021;12(6):566. doi: 10.1038/s41419-021-03839-w. IF 2022: 8.5 (Q1).

6. Marinescu CI, Preda MB, Neculachi CA, Rusu EG, Popescu S, Burlacu A. Identification of a hematopoietic cell population emerging from mouse bone marrow with proliferative potential in vitro and immunomodulatory capacity. Front Immunol. 2021;12:698070. doi: 10.3389/fimmu.2021.698070. IF 2021: 7.6 (Q1).

7. Preda MB, Lupan AM, Neculachi CA, Leti LI, Fenyo IM, Popescu S, Rusu EG, Marinescu CI, Simionescu M, Burlacu A. Evidence of mesenchymal stromal cell adaptation to local microenvironment following subcutaneous transplantation. J Cell Mol Med. 2020;24(18):10889–10897. doi: 10.1111/jcmm.15717. IF 2020: 5.3 (Q2).

POSTERE PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ŞTIINŢIFICE INTERNAŢIONALE

1. Neculachi CA, Nastase-Rusu EG, Zaccagnini G, Martelli F, Burlacu A, Preda MB. The role of hypoxamir-210 on macrophage behaviour. Poster presentation, International Conference and XXXIX Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology, Cluj-Napoca, Romania, Octombrie 21–23, 2022.

2. Neculachi CA, Nastase-Rusu EG, Marinescu-Colan CI, Preda MB, Burlacu A. MiR-210 deficiency enhances pro-inflammatory activation and disrupts M2 macrophage differentiation in murine models. Poster presentation, 42nd Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology, Bucharest, Romania, 20–21 Noiembrie, 2025.

3. Neculachi CA, Nastase-Rusu EG, Cherry L, Marinescu-Colan CI, Tastsoglou S, Cosman BP, Simionescu M, Martelli F, Preda MB, Burlacu A. MiR-210 is required for complete polarisation

of M2 macrophages. Poster presentation, CBFH Biennial Meeting – ESC Working Groups on Cellular Biology of the Heart and Myocardial Function, Naples, Italy, 26–28 Noiembrie 2025.

COMUNICĂRI ORALE SUSȚINUTE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE

1. Neculachi CA, prezentare orală în cadrul 9th COST Action CardioRNA MC and WG Meeting, "miR-210 at the overlap between hypoxia signalling and inflammatory pathways in macrophage biology", Universitatea din Nicosia, Nicosia, Cipru, 22-24 Februarie 2023

BURSE INTERNAȚIONALE

1. Neculachi CA. Bursă mobilitate de cercetare Short-Term Scientific Mission (STSM) acordată în cadrul COST Action CA17129 – CardioRNA: Functional Significance of the Non-Coding Genome in the Cardiovascular System. Titlul proiectului: miR-210 at the overlap between hypoxia signalling and inflammatory pathways in macrophage biology. Instituție gazdă: IRCCS Policlinico San Donato, Milano, Italia (coord. Prof. Fabio Martelli). Perioada: 15 iunie 2022 – 31 august 2022 (3 luni).

FINANȚAREA CERCETĂRILOR ȘI COLABORĂRI ÎN PROIECTE DE CERCETARE

1. Bursă doctorală – Academia Română (SCOSAAR), 2020–2023 (Contract nr. 60/02.11.2020).

2. Colaborator – Proiect PNRR-III-C9-2022-I8-186: „Targeting Cardiac Fibrosis in Heart Failure: Challenges and Potential Solutions Based on ncRNA Therapeutics" (FibroThera). Director de proiect: Dr. Fabio Martelli (Director științific, Laboratorul de Cardiologie Moleculară, I.R.C.C.S. Policlinico San Donato, Italia). Perioada: 2023–2026.

3. Colaborator – Proiect PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0172: „Targeting Innate Immune Mechanisms to Improve Risk Stratification and to Identify Future Therapeutic Options in Myocardial Infarction" (INNATE-MI). Director de proiect: Acad. Maya Simionescu. Perioada: 2020–2022.

4. Colaborator – Proiect PN-III-P1-1.1-TE-2019-1893: „MiR-210 Genomic Locus at the Overlap Between Hypoxia Signalling and Inflammatory Networks" (210-HINT). Director de proiect: Dr. Bogdan Preda. Perioada: 2021 –2022.

ACADEMIA ROMÂNĂ

INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ

„ NICOLAE SIMIONESCU”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

«Dezvoltarea și evaluarea funcţionalităţii unor nanocăr̆uși de polifenoli utilizabili în terapia ţintită a inflamaţiei vasculare»

Susținută în data de 18.09.2020, Aula «George Emil Palade»,
Institutul de Biologie și Patologie Celulară «Nicolae Simionescu»

Conducător ştiinţific:

Acad. MAYA SIMIONESCU

Doctorand:

ELENA-VALERIA FUIOR

BUCUREȘTI

2020

Textul integral poate fi consultat la Biblioteca Institutului de Biologie și Patologie Celulară «Nicolae Simionescu»

CUPRINS

LISTA ABREVIERILOR 6

INTRODUCERE ȘI OBIECTIVE 8

PARTEA I- STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTINȚELOR PRIVIND INFLAMAȚIA ȘI UTILIZAREA POLIFENOLILOR ÎNCORPORAȚI ÎN NANOPARTICULE ÎN TERAPIA ANTI-INFLAMATORIE 10

CAPITOLUL 1- INFLAMAȚIA: MECANISME IMPLICATE ȘI TERAPIILE ACTUALE 10

1.1. Inflamaţia și bolile asociate 10

1.2. Cascada inflamatorie 11

1.3. Căi de semnalizare în inflamaţie 13

1.4. Clase de proteine implicate în procesele inflamatorii 17

1.4.1. Citokine 17

1.4.2. Chemokine 21

1.4.3. Molecule de adeziune 24

1.5. Inflamaţia indusă de lipopolizaharid (LPS) 27

1.6. Abordări terapeutice actuale anti-inflamatoare 29

CAPITOLUL 2-ABORDĂRI ALTERNATIVE BAZATE PE POLIFENOLI ÎNCORPORAŢI ÎN NANOTRANSPORTORI ÎN TERAPIA INFLAMAŢIEI 33

2.1. Polifenoli-aspecte generale 33

2.2. Proprietăţile anti-oxidante și anti-inflamatorii ale polifenolilor 35

2.3. Modularea microARN necodante 35

2.4. Modularea microbiotei intestinale 36

2.5. Limitări în utilizarea polifenolilor 37

2.6. Aplicaţii pe bază de nanoparticule (NP) ale polifenolilor anti-inflamatori 38

2.6.1. Activități anti-inflamatorii ale NP anorganice încărcate cu polifenoli 39

2.6.2. Activități anti-inflamatorii ale NP organice încărcate cu polifenoli 39

2.6.2.1. Nanoparticule polimerice 39

2.6.2.2. Nanoparticule de ciclodextrină 41

2.6.2.3. Nanoparticule lipidice 42

2.6.2.4. Nanoparticule pe bază de proteine 45

2.6.3. Acumularea pasivă și ţintirea activă a nanoparticulelor la situsuri inflamatorii 46

2.6.4. Ţintirea specifică a diferitelor tipuri celulare cu nanoparticule încărcate cu polifenoli 47

2.6.5. Studii clinice 50
2.6.6. Concluzii 53
PARTEA a II a- CONTRIBUȚII ORIGINALE 54
CAPITOLUL 3- PREPARAREA ȘI CARACTERIZAREA *IN VITRO* A NANOEMULSIILOR LIPIDICE INCĂRCATE CU FLAVONOIDELE NARINGENINĂ ȘI HESPERETINĂ 54
3.1. Introducere și obiective 54
3.2. Materiale si metode 56
3.2.1. Reactivi 56
3.2.2. Prepararea nanoemulsiilor lipidice (LN) încărcate cu flavonoide 57
3.2.3. Prepararea nanoemulsiilor încărcate cu flavonoide și ţintite la VCAM-1 58
3.2.4. Caracterizarea nanoemulsiilor incărcate cu flavonoide 59
3.2.4.1. Dimensiunea nanoparticulelor 59
3.2.4.2 Potenţialul zeta al nanoparticulelor 60
3.2.4.3. Determinarea peptidei cuplate pe suprafaţa LN 60
3.2.4.4. Determinarea conţinutului de flavonoid încapsulat în nanoemulsii lipidice 61
3.2.4.5. Eliberarea in vitro a flavonoidelor încorporate în nanoemulsii 62
3.2.4.6. Studii de stabilitate a nanoemulsiilor lipidice incărcate cu flavonoide 63
3.2.5. Culturi celulare 63
3.2.6. Test de viabilitate celulară 63
3.2.7. Preluarea nanoemulsiilor lipidice de către celulele endoteliale umane, linia EA.hy926 64
3.2.8. Testul de adeziune a monocitelor la celulele endoteliale 64
3.2.9. Testul de transmigrare a monocitelor 65
3.2.10. Imuno-blot 66
3.2.11. Prepararea extractelor nucleare și citosolice 67
3.2.12. Real Time PCR 67
3.2.13. Testul de hemocompatibilitate 68
3.2.14. Analiza statistică 68
3.3. Rezultate 68
3.3.1. Prepararea și caracterizarea nanoemulsiilor lipidice: dimensiune și potenţial zeta 68
3.3.2. Eficienţa de încapsulare 72
3.3.3. Stabilitatea nanoemulsiilor lipidice încărcate cu flavonoide 72
3.3.4. Eliberarea in vitro a flavonoidelor din nanoemulsii 73
3.3.5. Citotoxicitatea nanoemulsiilor încărcate cu flavonoide asupra celulelor endoteliale (CE) umane, linia EA.hy926 75

3.3.6. Internalizarea nanoemulsiilor lipidice de către CE activate cu TNF-α 76

3.3.7. Rolul funcţional al nanoparticulelor încărcate cu flavonoid în reducerea adeziunii și transmigrării monocitelor la/printre CE activate cu TNF-α 79

3.3.8. Reducerea expresiei MCP-1 în CE activate cu TNF-α de către nanoemulsiile lipidice încărcate cu flavonoide 81

3.3.9. Reducerea translocării nucleare a NF-kB în CE activate cu TNF-α de către nanoemulsiile lipidice încărcate cu flavonoide 82

3.3.10. Hemocompatibilitatea nanoemulsiilor lipidice încărcate cu flavonoide 83

3.4. Discuţii 84

3.5. Concluzii 87

CAPITOLUL 4-BIODISTRIBUŢIA NANOEMULSIILOR LIPIDICE INCĂRCATE CU NARINGENINĂ DETERMINATĂ CU AJUTORUL TRASORULUI INDOCYANINE GREEN (ICG) 88

4.1. Introducere și obiective 88

4.2.Materiale si metode 90

4.2.1. Reactivi 90

4.2.2. Prepararea nanoemulsiilor încărcate cu naringenină conţinând ICG 91

4.2.3. Prepararea nanoemulsiilor încărcate cu naringenină conţinând rodamină 92

4.2.4. Prepararea nanoemulsiilor ţintite încărcate cu naringenină și ICG 92

4.2.5. Caracterizarea fizico-chimică a nanoemulsiilor 92

4.2.5.1. Dimensiunea nanoparticulelor 92

4.2.5.2. Potenţialul zeta al nanoparticulelor 92

4.2.5.3. Determinarea conţinutului de naringenină încorporată în nanoemulsii lipidice 92

4.2.6. Evaluarea stabilităţii nanoemulsiilor cu naringenină și ICG în prezenţa serului in vitro 93

4.2.7. Imagistică de fluorescenţă 93

4.2.8. Studii pe animale- Modelul experimental de inflamaţie murină indusă de LPS 93

4.2.9. Dozarea naringeninei în omogenate tisulare prin UHPLC 94

4.2.10. Analiza statistică 95

4.3. Rezultate 95

4.3.1. Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor cu narigenină și ICG 95

4.3.2. Stabilitatea nanoemulsiilor încărcate cu naringenină și ICG în prezenţa serului 97

4.3.3. Eficienţa radiantă a ICG încorporat în nanoemulsii 99

4.3.4. Biodistribuţia nanoemulsiilor încărcate cu naringenină în modelul de inflamaţie murină indusă de LPS 100

4.3.4.1. Biodistribuţia nanoemulsiilor încărcate cu naringenină evaluată prin eficienţa radiantă a ICG 100

4.3.4.2. Biodistribuţia nanoemulsiilor încărcate cu naringenină evaluată prin dozarea naringeninei prin UHPLC 108
4.4. Discuţii 110
4.5. Concluzii 115
CAPITOLUL 5-VALIDAREA IN VIVO A EFECTELOR ANTI-INFLAMATOARE ALE NANOEMULSIILOR LIPIDICE INCĂRCATE CU NARINGENINĂ 116
5.1. Introducere și obiective 116
5.2. Materiale si metode 116
5.2.1. Reactivi 116
5.2.2. Prepararea și caracterizarea nanoemulsiilor neţintite și tintite către VCAM-1, încărcate cu naringenină 117
5.2.3. Real Time PCR 117
5.2.4. Designul primerilor 118
5.2.5. Analiza statistică 118
5.2.6. Design experimental -Modelul experimental de inflamaţie acută indusă de LPS 118
5.3. Rezultate 119
5.4. Discuţii 126
5.5. Concluzii 130
CONCLUZII GENERALE 131
BIBLIOGRAFIE TEZĂ 133
E. LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ŞI COMUNICATE 157

Cuvinte cheie: inflamație, endoteliu activat, nanoparticule direcționate, nanoemulsii, VCAM-1, polifenol, flavonoid, naringenina, hesperetina, Indocyanine Green, TNF, LPS, transmigrare a monocitelor, adeziune a monocitelor

Număr total de pagini – 159

Număr de figuri în Partea I - 12

Număr de tabele în Partea I – 6

Număr de figuri în Partea a II a - 50

Număr de tabele în Partea a II a - 11

Referințe bibliografice - 358

Lucrări publicate în reviste indexate ISI in perioada stagiului de doctorat - 9 (1 autor principal)

Lucrări în pregătire -1

Capitole carte -1

Postere prezentate la manifestări ştiinţifice internaţionale-6 (autor principal)

Comunicări orale susținute la manifestări ştiinţifice naţionale - 1 (autor principal)

Premii naţionale - 2

Burse obținute pe durata programului doctoral -1 (bursă doctorală de la Academia Română)

Participarea la proiecte de cercetare naţionale legate de tematica tezei de doctorat- 1

Introducere și obiective

Bolile cronice inflamatorii reprezintă cauza cea mai importantă a mortalităţii globale. La nivel mondial, peste 50% din populaţie suferă decese datorate atacurilor vasculare cerebrale, bolilor cronice respiratorii, cardiovasculare, cancerului, obezităţii și diabetului.

Procesul cronic inflamator este implicat în numeroase patologii aparent neînrudite, ca o caracteristică unificatoare ce pare să le conecteze dincolo de diversitatea fenotipică. *Mai probabil o cauză decât un efect*, inflamaţia de intensitate redusă, dar persistentă (cronică) este asociată cu așa-numitele „boli ale civilizaţiei" precum bolile cardiovasculare, cancerul, boala obstructivă pulmonară cronică, diabetul, patologia neurodegenerativă. Conform statisticilor Organizaţiei Mondiale a Sănătăţii, patologiile menţionate se situează între primele cinci cauze ale mortalităţii la nivel global.

Având în vedere importanţa procesului inflamator în evoluţia diferitelor disfuncţii, noi termeni precum inflamaţia metabolică - „metaflamaţia" și inflamația asociată îmbătrânirii (în limba engleză „inflammageing") au fost introduși recent în vocabularul medical pentru a descrie legătura dintre inflamaţie și bolile cronice metabolice (diabet de tip II, obezitate) și, respectiv, implicarea inflamaţiei în procese fiziologice cum ar fi îmbătrânirea.

Actualmente, compușii anti-inflamatori de sinteză, steroidici și nesteroidici, reprezintă tratamentul de elecţie. Cu toate acestea, utilizarea acestora atrage variate efecte secundare nedorite.

În ultimele decenii, compușii fitochimici au atras interesul ca alternativă la medicaţia convenţională datorită profilului lor toxicologic sigur și acţiunii terapeutice în diferite boli. Dintre acești compuși, polifenolii-sub formă de compuși purificaţi sau ca extracte din diferite surse naturale-oferă numeroase oportunităţi terapeutice, prin inhibarea unor căi de semnalizare pro-inflamatoare.

Printre limitările utilizării terapeutice a polifenolilor pe scară largă sunt hidrosolubilitatea scăzută și, subsecvent, biodisponibilitatea redusă la administrare orală. Încorporarea acestor principii active în nanoparticule ar putea înlătura dezavantajele menţionate, mai ales în condiţiile dezvoltării de terapii pentru livrarea direcţionată a compușilor bioactivi la situsurile inflamate, limitând atât disiparea substanţei utile în circulaţia sistemică, cât și efectele secundare nedorite.

În acest context, endoteliul vascular reprezintă o ţintă atractivă pentru nanoparticulele funcţionalizate către moleculele de adeziune ce sunt supraexprimate pe suprafaţa celulei în condiţiile activării de către diferiţi agenţi stresori.

Având în vedere efectele anti-inflamatorii benefice descrise pentru flavonoidele din citrice-naringenină și hesperetină, s-a preconizat că prin încorporarea într-un nanotransportor, direcţionat specific prin administrare intravenoasă către situsurile vasculare inflamate, acești compuși ar avea o eficacitate terapeutică crescută.

Anterior, în cadrul Laboratorului de Nanoterapii, liposomi directionaţi către molecula de adeziune VCAM-1 au fost eficienţi în ţintirea și reducerea activării endoteliului în ateroscleroză și cancer. Pe baza acestor date, a fost formulată ipoteza conform căreia, încapsularea celor două flavonoide, naringenina și hesperetina, în nanoemulsii lipidice direcţionate către VCAM-1 ar putea fi utilizată pentru reducerea inflamaţiei induse de TNF-α în celulele endoteliale.

În lucrarea de faţă ne-am propus și am realizat următoarele **obiective**: (**1**) conceperea, prepararea și caracterizarea de nanoparticule lipidice în scopul folosirii lor ca vectori pentru transportul ţintit de polifenoli, cum sunt flavonoidele din citrice, naringenina și hesperetina; (**2**) încărcarea nanoparticulelor cu polifenolii menţionaţi la obiectivul 1 și funcţionalizarea acestora în vederea direcționării lor către o țintă moleculară relevantă în inflamația vasculară, anume molecula

de adeziune celulară VCAM-1; (**3**) validarea preclinică a nanoparticulelor lipidice, încărcate cu polifenoli, ca vectori anti-inflamatori prin studii *in vitro* și *in vivo*.

Structura tezei de doctorat

Lucrarea este structurată în două părți principale, subdivizate în capitole.

Prima parte, alcătuită din două capitole, reprezintă o trecere în revistă a literaturii de specialitate și analizează stadiul actual al cunoștințelor privind inflamația și utilizarea polifenolilor încorporați în nanoparticule în terapia anti-inflamatorie. **Capitolul 1** se referă la mecanismele celulare și moleculare ale cascadei inflamatorii și la abordările terapeutice actuale care țintesc aceste evenimente. Sunt menționate principalele clase de agenți anti-inflamatori: glucocorticoizi, medicamente nesteroidice, statine, agenți biologici (inhibitori de citokine) și mecanismul acțiunii acestora. **Capitolul 2** reprezintă o recenzie a literaturii de specialitate referitoare la utilizarea polifenolilor încorporați în nanosisteme în scopuri anti-inflamatorii. Polifenolii reprezintă o clasă extinsă de compuși, metaboliți secundari ai plantelor, cu numeroase efecte terapeutice, anti-oxidante și anti-inflamatoare, antimicrobiene, anti-tumorale, anti-angiogenice și imunomodulatoare. Utilizarea terapeutică pe scara largă este însă împiedicată de hidrosolubilitatea și biodisponibilitatea scăzute. O strategie pentru îmbunătăţirea biodisponibilităţii o reprezintă încorporarea polifenolilor în diferite formule de nanoparticule: liposomi, nanoemulsii. O serie de studii clinice au demonstrat că biodisponibilitatea polifenolilor poate fi îmbunătăţită semnificativ prin nanoformulare. Studii preclinice și clinice au arătat efectele benefice ale polifenolilor încorporaţi în nanoparticule în diverse modele experimentale sau pacienţi cu condiţii inflamatorii associate, date fiind disponibile cu precădere pentru curcumină și resveratrol. Datele recenzate recomandă nanotehnologia ca o soluţie atractivă pentru a maximiza efectele terapeutice ale compușilor anti-inflamatori naturali, pentru o mai promptă utilizare clinică. De asemenea se evidențiază necesitatea explorării unei game mai diverse de compuși. Recenzia realizată în **Capitolul 2** a fost publicată în anul 2020 sub forma unui capitol de carte [**1**].

Partea a doua a lucrării cuprinde contribuțiile originale, organizate în trei capitole.

Capitolul 3 prezintă un studiu referitor la efectele anti-inflamatoare *in vitro* ale flavonoidelor din citrice-naringenină și hesperetină-încorporate în nanoemulsii lipidice utilizând linia de celule endoteliale umane EA.hy926.

Naringenina și hesperetina, principalele flavonoide din fructele citrice, fie în formă liberă, sau ca glicozide prezente în mod natural, sunt intens investigate în prezent pentru potenţialul terapeutic în ateroscleroză și diabetul de tip II, două din patologiile cu răspândire pandemică la nivelul societăţilor dezvoltate. Aceste flavonoidele exercită un spectru larg de activităţi: anti-oxidante, anti-inflamatoare, de reducere a glicemiei și lipemiei și îmbunătăţire a parametrilor metabolici: corectează dislipidemia, cresc toleranţa la glucoză și responsivitatea la insulină, reduc inflamaţia și adipozitatea.

O serie de studii anterioare din literatură au descris încorporarea acestor compuși în nanoparticule destinate mai ales administrării orale. Puţine încercări de direcţionare specifică a flavonoidelor din citrice la situsuri patologice în vederea creșterii concentraţiei locale efective au fost raportate în literatură. La momentul inițierii cercetărilor nu existau studii referitoare la nanoparticule direcționate conținând naringenină destinate administrării intravenoase.

În studiul prezentat în **Capitolul 3** este descrisă încorporarea naringeninei și hesperetinei, flavonoide cu hidrosolubilitate scăzută, în nanoemulsii lipidice. În plus, nanoparticulele au fost direcționate specific către molecula de adeziune celulară VCAM-1, supraexprimată pe suprafața endoteliului activat. Nanoemulsiile au fost testate funcțional *in vitro*.

Principalele rezultate:

- S-a reușit încorporarea flavonoidelor cu eficiență ≥ 80%, iar nanoemulsiile au prezentat stabilitate bună *in vitro* în condițiile menținerii timp de 3 luni la 4ºC sau o săptămână la 37 ºC.
- Caracterizarea fizico-chimică a indicat dimensiuni ale nanoparticulelor de ~200 nm, independent de încărcarea cu flavonoid și cuplarea cu peptida de recunoaștere a VCAM-1, iar indicii de polidispersie de ~0.2 au indicat omogenitatea populațiilor.
- Potențialul zeta al nanoparticulelor nedirectionate s-a situat în jurul valorii de -30 mV. Cuplarea cu peptida de recunoaștere a VCAM-1 a deplasat valorile potențialului zeta spre valori mai negative, proporțional cu cantitatea de peptidă cuplată.
- Studiile de eliberare *in vitro* în modelul săculeţului de dializă au indicat că naringenina și hesperetina au fost eliberate din nanoemulsii cu o cinetică mai lentă decât compușii puri. Cinetica eliberării s-a desfășurat după un model Weibull (exponențială monofazică).
- Nanoemulsiile încărcate cu flavonoide nu au manifestat citotoxicitate *in vitro* pe linia de celule endoteliale umane EA.hy926 la concentrațiile testate (25, 50, 100 µM) și au prezentat hemocompatibilitate la șoareci apoE deficienţi și C57/Black6.
- Nanoemulsiile încărcate cu flavonoide, neţintite sau ţintite către endoteliu, sunt preluate de celulele endoteliale umane din linia EA.hy926 într-o manieră dependentă de doză și timp, dar dependentă de TNF-α doar în cazul endoteliului activat.
- Teste funcţionale au arătat că flavonoidele încorporate în nanoemulsii, la o concentrație de 50 µM, au inhibat atât adeziunea cât și transmigrarea monocitelor THP-1 la/printre celulele endoteliale activate, printr-un mecanism care implică scăderea expresiei la nivel de genă și proteină a chemokinei pro-inflamatorii MCP-1 și reducerea translocării nucleare a NF-κB. Efectele au fost mai pronunțate în cazul nanoparticulelor direcționate.

Rezultatele acestui studiu au fost publicate în revista *Pharmaceutics* (factor de impact 4,773) [**2**].

În studiul prezentat în **Capitolul 4** am investigat biodistribuţia nanoparticulelor ce încorporează naringenină într-un model experimental de inflamaţie acută indusă de LPS. Deoarece naringenina ca atare nu prezintă caracteristici spectrale care să permită evaluarea localizării nanoparticulelor *in situ*, pentru marcare am utilizat trasorul de domeniu infraroșu apropiat Indocyanine Green (ICG) și am încercat să stabilim o corelaţie între distribuţia fluorescenţei ICG prin IVIS și concentraţiile de naringenină dozate prin HPLC. ICG este un trasor intens investigat în prezent datorită tropismului pentru sistemul cardiovascular, ca alternativă la tehnici invazive și/sau toxice de investigaţie. Combinaţia naringenină/ICG în nanocăraușI nu a mai fost raportată în literatură și domeniul utilizării ICG în urmărirea biodistribuţiei unor substanţe active încorporate în nanosisteme de transport este unul de mare actualitate.

Principalele rezultate:

- Pentru evaluarea potenţialului de ţintire al nanoparticulelor încărcate cu naringenină și direcţionate către molecula de adeziune celulară VCAM-1, am obţinut în premieră nanoparticule ce co-incorporează naringenină și trasorul NIR Indocyanine green (ICG). S-au obținut nanoemulsii

stabile timp de 3 luni la 4ºC, conținând naringenină și ICG, nedirecționate sau direcționate la VCAM-1.

- Dimensiunile nanoparticulelor au fost ~220 nm, iar potențialul zeta a fost de ~ -40 mV.
- Nu s-au evidențiat modificări ale potențialului zeta datorită funcționalizării cu peptida de recunoaștere a VCAM-1, spre deosebire de cazul nanoemulsiilor ce conțin doar naringenină.
- ICG încorporat în nanoemulsii a prezentat un semnal liniar de fluorescență pe domeniul 0-60 µM. Deși eficiența radiantă a fost de 10 ori mai scăzută decât a rodaminei, liniaritatea semnalului a fost superioară.
- Nanoemulsiile cu ICG și naringenină au fost stabile în prezența serului murin la 37ºC *in vitro*.
- Pentru urmărirea biodistribuției nanoparticulelor, acestea au fost administrate intravenos într-un model experimental de inflamație indusă cu LPS la șoareci C57/Black6. Nanoemulsiile s-au distribuit nespecific în ficat, rinichi, plămâni, splină, creier, așa cum s-a demonstrat prin analiza *ex vivo* a organelor prin tehnica IVIS. Nanoemulsiile s-au distribuit specific la nivelul segmentului (inimă+aortă), ca și în aortele individuale. Distribuirea selectivă a fost atribuită funcționalizării cu peptida de recunoaștere a VCAM-1, deoarece în aceleași condiții ICG liber s-a distribuit nespecific, iar nanoemulsiile au fost echivalente din punct de vedere al dimensiunilor și potențialului zeta, singura diferență constând în prezența peptidei de cuplare.
- Evaluarea concentraţiei de naringenină prin UHPLC a indicat o corelație satisfăcătoare cu datele de fluorescență, iar cauzele anumitor discrepanțe sunt analizate.

Coroborate, aceste date susţin utilitatea nanoparticulelor încărcate cu ICG în urmărirea localizării după administrarea intravenoasă la șoarece. În plus, ele arată că nanoparticulele ţintite către VCAM-1 s-au localizat preferenţial în anumite situsuri ale endoteliului activat, unde au eliberat agentul activ.

Capitolul 5 se referă la studiul efectelor anti-inflamatoare ale nanoparticulelor încorporând naringenină *in vivo* într-un model experimental de inflamaţie indusă de LPS. Rezultatele experimentelor de qRT-PCR pe organe prelevate de la șoareci cu inflamaţie indusă de LPS au confirmat potenţialul terapeutic al naringeninei încorporate în nanoemulsii. Datele noastre arată la animalele tratate cu nanoparticule ţintite, o reducere a expresiei genice a unor markeri inflamatori precum TNF-α, IL-1β. MCP-1, RANTES, VCAM-1 și ICAM-1. Sumarul cazurilor în care nanoemulsiile încărcate cu naringenină au avut un efect mai puternic în reducerea expresiei genice a markerilor inflamatorii în varianta ţintită către VCAM-1 comparativ cu cea neţintită este prezentat în Tabelul 1.

Molecula	Diferenţe cu semnificaţie statistică	Diferenţe fără semnificaţie statistică
TNF-α	rinichi	Inimă, plămâni, creier
IL-1β	plămâni	Inimă
MCP-1		Rinichi, plamân, splină, creier, inimă
RANTES	creier	Plamâni, inimă
VCAM-1	plămâni	Splină, inimă
ICAM-1		Plamâni, inimă, creier

Tabelul 1. *Sumarul cazurilor în care nanoemulsiile încărcate cu naringenină au avut un efect mai puternic în varianta ţintită către VCAM-1 comparativ cu cea neţintită în reducerea expresiei genice a markerilor inflamatori evaluați.*

Deși diferenţe statistice semnificative între nanoemulsiile ţintite către VCAM-1 și cele neţintite s-au înregistrat doar în câteva situaţii punctuale (IL-1β în plămâni, TNF-α în rinichi, RANTES în creier, VCAM-1 în plămâni), totuși evaluarea de ansamblu a panelului de markeri inflamatori indică o tendinţă anti-inflamatoare.

Această lucrare aduce următoarele **contribuţii originale**:

(i) conceperea și caracterizarea nanoemulsiilor lipidice care încorporează flavonoide din citrice;
(ii) funcţionalizarea acestora cu o peptidă de recunoaștere a moleculei de adeziune VCAM-1;
(iii) demonstrarea preluării specifice a nanoemulsiilor direcţionate la VCAM-1 de către celule endoteliale umane activate cu TNF-α;
(iv) validarea activităţii anti-inflamatoare *in vitro* prin reducerea adeziunii și transmigrării monocitelor la/prin endoteliu;
(v) conceperea și caracterizarea nanoemulsiilor lipidice încărcate cu naringenină și etichetate fluorescent prin co-încorporarea fluorocromului NIR, Indocyanine Green;
(vi) urmărirea ţintirii specifice a endoteliului *in vivo* folosind un model murin de inflamaţie, pe baza determinării fluorescenţei NIR a nanoemulsiilor lipidice;
(vii) validarea *in vivo* a efectelor anti-inflamatoare ale nanoemulsiilor încărcate cu naringenină.

REFERINŢE:

1. **Fuior E**, Calin M: Nanoparticle-based delivery of polyphenols for the treatment of inflammation-associated diseases in *Advances and Avenues in the Development of Novel Carriers for Bioactives and Biological Agents* 1st Edition, Elsevier (2020) (capitol carte)

2 . **Fuior EV**, Deleanu M, Constantinescu CA, Rebleanu D, Voicu G, Simionescu M, Calin M. Functional Role of VCAM-1 Targeted Flavonoid-Loaded Lipid Nanoemulsions in Reducing

Endothelium Inflammation. Pharmaceutics. 2019;11(8). pii: E391. doi: 10.3390/pharmaceutics11080391(**IF 4,77**).

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ŞI COMUNICATE

In perioada desfășurării stagiului de doctorat (2015-2020) au fost publicate următoarele lucrări:

UN CAPITOL ÎNTR-O MONOGRAFIE APĂRUTĂ ÎN STRĂINĂTATE

Fuior, E.V., Calin, M. 2020. Nanoparticle-based delivery of polyphenols for the treatment of inflammation-associated diseases in *Advances and Avenues in the Development of Novel Carriers for Bioactives and Biological Agents* (editor Singh M et al.) ELSEVIER, Academic Press, pp 343-382, eBook ISBN: 9780128199183

LUCRĂRI PUBLICATE IN REVISTE INTERNAȚIONALE COTATE ISI:

ARTICOLE ORIGINALE : 1 LUCRARE PRIM-AUTOR SI 8 LUCRĂRI CO-AUTOR

1. **Fuior E.V.**, Deleanu M., Constantinescu C.A., Rebleanu D., Voicu G., Simionescu M., Calin M. Functional Role of VCAM-1 Targeted Flavonoid-Loaded Lipid Nanoemulsions in Reducing Endothelium Inflammation. Pharmaceutics. 2019; 11(8):391. doi: 10.3390/pharmaceutics11080391. (factor de impact 4,77).

2. Constantinescu C.A., **Fuior E.V.**, Rebleanu D., Deleanu M., Simion V.., Voicu G., Escriou V., Manduteanu I., Simionescu M., Calin M. Targeted Transfection Using PEGylated Cationic Liposomes Directed Towards P-Selectin Increases siRNA Delivery into Activated Endothelial Cells. Pharmaceutics. 2019;11(1):47. doi: 10.3390/pharmaceutics11010047. (factor de impact 4,77)

3. Voicu G., Rebleanu D., Constantinescu C.A., **Fuior E.V.**, Ciortan L., Droc I., Uritu C.M., Pinteala M., Manduteanu I, Simionescu M, Calin M. Nano-Polyplexes Mediated Transfection of Runx2-shRNA Mitigates the Osteodifferentiation of Human Valvular Interstitial Cells. Pharmaceutics. 2020;12(6):507. doi: 10.3390/pharmaceutics12060507. (factor de impact 4,84)

4. Trusca V.G., **Fuior E.V.**, Kardassis D., Simionescu M., Gafencu A.V.Int J Mol Sci. The Opposite Effect of c-Jun Transcription Factor on Apolipoprotein E Gene Regulation in Hepatocytes and Macrophages. 2019;20(6):1471. doi: 10.3390/ijms20061471.

5. Trusca V.G, **Fuior E.V**, Fenyo I.M., Kardassis D., Simionescu M., Gafencu A.V. Differential action of glucocorticoids on apolipoprotein E gene expression in macrophages and hepatocytes.
PLoS One. 2017;12(3):e0174078. doi: 10.1371/journal.pone.0174078.

6. Roman C, **Fuior E.V.**, Trusca V.G., Kardassis D., Simionescu M., Gafencu A.V. Biochem Biophys Thyroid hormones upregulate apolipoprotein E gene expression in astrocytes.
Res Commun. 2015;468(1-2):190-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.132.

7. Niculescu L.S., Simionescu N., **Fuior E.V.**, Stancu C.S, Carnuta M.G., Dulceanu M.D., Raileanu M., Dragan E., Sima A.V. Inhibition of miR-486 and miR-92a decreases liver and plasma cholesterol levels by modulating lipid-related genes in hyperlipidemic hamsters. Mol Biol Rep. 2018;45(4):497-509. doi: 10.1007/s11033-018-4186-8.

8. Brehar F.M., Gafencu A.V., Trusca V.G., **Fuior E.V.**, Arsene D., Amaireh M, Giovani A., Gorgan M.R.Preferential Association of Lissencephaly-1 Gene Expression with CD133+ Glioblastoma Cells. J Cancer. 2017;8(7):1284-1291. doi: 10.7150/jca.17635.

9. Trusca V.G., Mihai A.D., **Fuior E.V.**, Fenyo I.M., Gafencu A.V. High levels of homocysteine downregulate apolipoprotein E expression via nuclear factor kappa B. World J Biol Chem. 2016;7(1):178-87. doi: 10.4331/wjbc.v7.i1.178.

2 RECENZII :

1. **Fuior E.V.**, Gafencu A.V. Apolipoprotein C1: Its Pleiotropic Effects in Lipid Metabolism and Beyond.Int J Mol Sci. 2019;20(23):5939. doi: 10.3390/ijms20235939.

2.Trusca V.G., **Fuior E.V.**, Gafencu A.V. Beyond Lipoprotein Receptors: Learning from Receptor Knockouts Mouse Models about New Targets for Reduction of the Atherosclerotic Plaque.Curr Mol Med. 2015;15(10):905-31. doi:10.2174/ 1566524016666151123110310.

1 MANUSCRIS IN PREPARARE (PRIM-AUTOR)

1. Fuior, E.V., Constantinescu, C.A., Voicu, G., Deleanu, M., Anghelache M, Rebleanu, D., Simionescu, M., Calin, M. 2020 Evaluation of the therapeutic effects of naringenin incorporated in nanoemulsions in experimental acute inflammation *(manuscris în preparare)*

LUCRĂRI PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ŞTIINŢIFICE INTERNAŢIONALE: 6

1. Fuior, E.V., Voicu, G., Deleanu, M., Rebleanu, D., Constantinescu, C. A., Safciuc, F., Simionescu, M., Calin, M. *VCAM-1 targeted flavanone-loaded lipid nanoemulsions exert anti-inflammatory effects on activated endothelial cells,* BAHH2Workshop "Modern Biotechnological Advances for Human Health" organizat de INCDSB și International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, 28-31mai 2019, București, Book of Abstracts p.75 (poster)
2. Fuior, E.V., Deleanu, M., Constantinescu, C. A., Rebleanu, D., Voicu, G., Simionescu, M., Calin, M. *Flavonoids-Loaded Lipid Nanoemulsions Protect Against Endothelial Inflammation By A Mechanism Involving NF-kB Transcription Factor and MCP-1 Chemokine*, Al 11 lea Congres Naţional cu participare internaţională și a 37a sesiune anuală a Societăţii Române de Biologie Celulară (sub egida Academiei Române), 20-23 iunie 2019, Constanţa, Book of Abstracts p. 128 (poster)
3. Fuior, E.V., Voicu, G., Deleanu, M., Rebleanu, D., Constantinescu, C.A., Safciuc, F., Simionescu, M., Călin, M. *VCAM-1 targeted flavanone-loaded lipid nanoemulsions exert anti-inflammatory effects on activated endothelial cells*– Simpozion aniversar IBPC "An incredible 40-year journey to uncover cell's secrets for the benefit of human health", 19-20 septembrie 2019, București, România (poster)
4. Fuior, E.V., Deleanu, M., Voicu, G., Rebleanu, D., Constantinescu, C.A., Safciuc, F, Simionescu, M., Calin, M. *Preparation and characterization of endothelium-targeted flavonoid-loaded lipid nanoemulsions*– The 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 10th

National Congress with International Participation**:** 6-9 iunie 2018, Craiova, România (poster)- premiul I la sectiunea POSTERE

5. Fuior, E.V., Voicu, G., Deleanu, M., Rebleanu, D., Constantinescu, C.A., Safciuc, F., Simionescu, M., Calin, M. *VCAM-1 targeted naringenin-loaded lipid nanoemulsions reduce monocyte adhesion to activated endothelial cells*- International Conference on Nanotechnology and Bioscience, 24-28 septembrie 2018, Heraklion, Creta, Grecia (NanoBio 2018 Abstract Book, p. 153, WS1-P21)

6. Fuior E.V., Voicu G., Deleanu M., Rebleanu D., Constantinescu C.A., Safciuc F., Simionescu M., Calin M.– *VCAM-1 targeted naringenin-loaded lipid nanoemulsions reduce monocyte adhesion to activated endothelial cells* –"Advances in proteomics and progress in precision medicine": 24-26 Octombrie 2018, București, România (poster FrPo11, Program Booklet p.14)

LUCRĂRI PREZENTATE LA MANIFESTĂRI STIINȚIFICE NAȚIONALE: 1 LUCRARE

Fuior E.V. -*Reducerea activării endoteliului cu ajutorul nanoemulsiilor lipidice incărcate cu polifenoli*, Școala de Vară INTERA 3 "Nanoparticule inteligente pentru livrarea direcționată de compuși bioactivi: preparare, caracterizare, aplicații" 23-24 mai 2019, București (prezentare orală)

BURSE OBȚINUTE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL: 1 (BURSĂ DOCTORALĂ DE LA ACADEMIA ROMÂNĂ)

PREMII : 2

Fuior, E.V., Deleanu, M., Voicu, G., Rebleanu, D., Constantinescu, C.A., Safciuc, F, Simionescu, M., Calin, M. *Preparation and characterization of endothelium-targeted flavonoid-loaded lipid nanoemulsions*– The 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 10th National Congress with International Participation: 6-9 iunie 2018, Craiova, România (poster)- premiul I la sectiunea POSTERE

Fuior, E.V., Deleanu, M., Constantinescu, C.A., Rebleanu, D., Voicu, G., Simionescu, M., Calin, M. 2019. Functional Role of VCAM- 1 Targeted Flavonoid-Loaded Lipid Nanoemulsions in Reducing Endothelium Inflammation. *Pharmaceutics*, 11(8):391. doi:10.3390/ pharmaceutics11080391 (Factor de impact 4,77)- premiu UEFICDI-Premierea rezultatelor cercetării PRECISI 2019.

FINANȚAREA CERCETĂRILOR:

Proiect INTERA3: "**Nanobioparticule inteligente concepute pentru vectorizarea compusilor bioactivi in terapia inflamatiei vasculare"** în cadrul proiectului complex "Terapii inteligente pentru boli non-comunicabile, bazate pe eliberarea controlată de compuși farmacologici din celule încapsulate după manipulare genetică sau bionanoparticule vectorizate**",** PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697/ Contract **UEFISCDI nr. 13PCCDI/2018** Director: Dr. Manuela Călin

ROMANIAN ACADEMY
School of Advanced Studies of the Romanian Academy
The Institute of Cellular Biology and Pathology
`Nicolae Simionescu`

PHD THESIS ABSTRACT

Cardiac cell alteration driven by the aberrant expression of ageing-associated miRNAs

PhD supervisor:
Dr. Alexandrina BURLACU

PhD candidate:
Evelyn-Gabriela NASTASE-RUSU

2025

Content

ABBREVIATION LIST **6**

INTRODUCTION AND GENERAL OBJECTIVES **10**

PART I- CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

I. THE ROLE OF AGEING IN THE ONSET OF HEART DISEASE **17**

I.1 Characteistics of ageing 17
I.2 Cardiac modification associated with ageing 23
I.3 Age-related cardiac remodeling after ischemic heart disease 34

II.THE CARDIAC FIBROLAST **42**

II.1 General characteristics 42
II.2 Cardiac fibroblast în cardiac homeostasis 46
II.3 Cardiac fibrobalst în fibrosis 49

III. MIRNAs IN CARDIAC AGEING AND AGE-RELATED PATHOLOGIES **56**

III.1 Nomencleature and genomic organization of microRNAs 58
III.2 miRNA biogenesis 60
III.3 miARNs-mechansims of action 65
III.4 Dysregulated microRNAs in cardiac ageing and associated heart diseases 67
III.5 MicroARN as therapeutic targets in cardiac fibrosis 71

PART II-ORIGINAL CONTRIBUTIONS

I. MIRNAs INVOLVED IN NATURAL AGEING:IMPACT ON CARDIOVASCULAR DISEASES **74**

MiR-29a increase in ageing may function as a compensatory mechanism against cardiac fibrosis through Serpinh1 downregulation **74**

I.1 Introduction and objectives 74
I.2 Experimental protocols and methods of analysis 75
I.3 Results 82
I.4 Discutions and conclusions 99

II. INVESTIGATION OF MIRNAs WITH REDUCED EXPRESSION IN CARDIAC FIBROBLASTS DURING NATURAL AGEING **106**

Introduction and objectives 106

II.1 Isolation and characterization of primary murine fibroblasts and cardiomyocytes **107**

II.1.1 Experimental protocols and methods of analysis 107

II.1.2 Results 117
II.1.3 Discutions and conclusions 127

II.2 MiRNAs generated from Meg3-Mirg locus are downregulated during aging 128
II.2.1 Experimental protocols and methods of analysis 128
II.2.3 Results 133
II.2.4 Discutions and conclusions 152

III. INVESTIGATION OF MIRNAs WITH INCREASED EXPRESSION IN CARDIAC FIBROBLASTS DURING NATURAL AGEING 156

MiR-10b activation in cardiac fibroblast attenuates the adverse cardiac remodelling after myocardial infarction during ageing by targeting Lpar…….156
III.1 Introduction and objectives 156
III.2 Experimental protocols and methods of analysis 157
III.3 Results 169
III.4 Discutions and conclusions 194

GENERAL CONCLUSIONS OF THE THESIS 202

REFERENCES 206

EFFECTIVENESS AND DISSEMINATION OF RESEARCH 239

Papers published in ISI journals as first author 239
Papers published in ISI journals as first co-author 239
Oral communications at international scientific conferences 240
Posters presented at international scientific conferences 241
Specialisations and courses completed during the doctoral programme 241
Awards 241

RESEARCH FUNDING AND COLLABORATIONS IN RESEARCH PROJECTS 243

SUMMARY

Keywords: Ageing; Cardiac fibrosis; miRNA; Fibroblast; Myocardial infarction; Maladaptative remodelling; Serpinh1; Lpar2; miR-10b; Meg3-Mirg; miR-29a

Total number of pages:242

Number of figures in part I: 22

Number of tables in part I: 0

Number of figures in part II: 68

Number of tables in part II: 4

Bibliographic references: 441

Papers published in ISI-indexed international journals: 8 (2 autor principal)

Oral communications presented at international scientific events: 2

Posters presented at international scientific events: 5

Specialisations and courses: 2

Awards: 2

Participation in research projects: 7

Introduction and objectives

The increase in human longevity has stimulated the interest of scientists to understand the fundamental mechanisms underlying natural aging. Ageing is a complex and still insufficiently understood phenomenon, involving a gradual decline in cellular and organ function that leads to higher incidence of chronic diseases. Numerous genetic and epigenetic modifications, as well as imbalances in biochemical processes, are tightly linked to ageing, some of which are now reorganized as hallmarks of this process (Gupta et al., 2014). According to *World Heart Report, 2023*, although the age-standardized mortality rate has decreased by one third between 1990 and 2019, cardiovascular diseases remain the leading cause of death in the world, with the number of deaths increasing by 33% over the last 30 years.

Structural and functional alterations of the heart that occur during ageing may ultimately result in heart failure (North and Sinclair, 2012). The major manifestations of cardiac ageing include fibrosis (Biernacka and Frangogiannis, 2011), chronic inflammation (Ferrucci and Fabbri, 2018), hypertrophy (Olivetti et al., 2000), and impaired angiogenesis (Lähteenvuo and Rosenzweig, 2012). When studying cardiac structure and function, most attention is traditionally given to cardiomyocytes, despite the fact that non-myocyte cells represent the majority of the heart cellular population. Among these, cardiac fibroblasts form a heterogeneous and dynamic group with essential structural and functional roles in cardiac homeostasis, both under physiological and pathological conditions. Cardiac fibroblasts account for approximately 15% of the total cell population in the adult murine myocardium, are interspersed among cardiomyocytes, and possesses a specific molecular programme that enables them to rapidly integrate and respond to extra cellular cues following injury (Tallquist and Molkentin, 2017). Activation of fibrotic signalling pathways in response to ageing related stress leads to cardiac fibrosis and hypertrophy. These are two key features of cardiac ageing that are strongly interconnected and mutually triggered by each other. Consequently, cardiac ageing is often associated with diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF), which has a negative effect in the elderly population(Singam et al., 2020).

Myocardial infarction (MI) is one of the most devastating cardiovascular events. Ageing not only increases the risks of MI but also worsens post-infarction outcomes, as aged hearts exhibit impaired angiogenesis, inefficient resolution of inflammation, and reduced regenerative capacity (Olivetti et al., 1991, Dai et al., 2012). This processes ultimately drive

maladaptive myocardial remodelling. A central feature of this remodelling is cardiac fibrosis, defined by excessive deposition of extracellular matrix (ECM) proteins,particularly collagen. While fibrosis initially stabilizes the injured myocardium, excessive ECM accumulation compromises ventricular compliance, disrupts electrical conduction, and eventually contributes to heart failure (Travers et al., 2016).

Cardiac fibroblasts are the main contributors to post-MI fibrosis, but they also influence other aspects of healing, including inflammation (Theall and Alcaide, 2022) and scar maturation (Daseke et al., 2020). Thus, dysregulated activation of cardiac fibroblasts in the early stages of injury can therefore result in defective healing and worsened cardiac performance. In the later phases, the fibrotic scar-initially crucial for survival, undergoes extensive crosslinking, which increases tensile strength but compromises contractility(Deb and Ubil, 2014). These processes ultimately contribute to systolic dysfunction and chronic heart failure (Smolgovsky et al., 2021).

Increasing evidence highlights the important role of microRNAs (miRNAs) in cardiovascular pathologies associated with ageing. Some miRNAs display pro-fibrotic activity, while others exert anti-fibrotic effects in MI and fibrotic remodelling in the aged hearts. The discovery of the association between miRNAs and some diseases has fueled the interest in their therapeutic potential as a novel class of drugs. Moreover, the global success of mRNA vaccines against SARS-CoV-2 has further increased the interest for RNA-based therapies, which are now emerging as a real treatment option (Seyhan, 2024).

Based on these considerations, our **hypothesis** is that dysregulation of the miRNAs expression profile during ageing disrupts the molecular mechanisms that maintain homeostasis, and leads both to systemic functional decline and to the initiation of pathological processes such as cardiac fibrosis and maladaptive post-MI remodelling. Thus, the **aim** of this thesis was to explore the role of miRNAs as key regulators of cellular homeostasis and as potential therapeutic targets capable of counteracting pathological processes such as ECM remodelling and cardiac fibrosis. By doing so, this work contributes to the identification of innovative strategies to promote healthy ageing and prevent age-associated complications. To achieve this aim, the research carried out during my doctoral studies pursued the following **specific objectives**:

1. To identify the expression profile of miRNAs involved in the pathophysiology of the cardiovascular system in individual cardiac cell populations isolated from aged mice;

2. To assess the in vitro effects of ageing-associated miRNAs on cardiac fibroblasts, focusing on their impact on the pro-fibrotic phenotype and signalling pathways related to ageing (inflammation and tissue remodelling);

3. To determine the therapeutic potential of miRNA modulation on post-MI the maladaptive remodelling in the ageing heart.

Thesis structure

The doctoral thesis is organised into two main parts:

Part 1 - Current state of knowledge is divided into 3 main chapters**. Chapter 1**, "*The role of ageing in the onset of cardiovascular diseases*", addresses general future of ageing, cardiac alterations associated with ageing, and finally, Age-related cardiac remodeling after ischemic heart disease. **Chapter 2**," *The cardiac fibroblast*", highlights aspects of the cardiac fibroblast, from its general characteristics to its role in cardiac homeostasis and fibrosis. Finally, **Chapter 3** focuses on "*The role of miRNAs in cardiac ageing and ageing-related pathologies*". This chapter provides a synthesis of the literature regarding miRNAs nomenclature and genomic organization, their biogenesis, mechanisms of action, and their dysregulation in cardiac ageing and age-related cardiovascular diseases. At last, the chapter reviews several preclinical studies regarding the use of miRNAs in cardiac fibrosis therapy.

Part 2 - Original contributions, presents the original results obtained in the studies carried out to fulfil the objectives of the thesis. It is divided into three chapters, whose main results and conclusions are summarised below:

Chapter 1- MIRNAs INVOLVED IN NATURAL AGEING: IMPACT ON CARDIOVASCULAR DISEASES, includes the study" *MiR-29a increase in ageing may function as a compensatory mechanism against cardiac fibrosis through Serpinh1 downregulation*". In this work, we focused on identifying the roles of four miRNAs (miR-18a, miR-21, miR-22 and miR-29a), known to be involved in cardiovascular diseases during ageing. Using molecular biology, biochemical techniques and cell culture models, we showed that cardiac ageing is associated with increased expression of miR-18a, miR-21a, miR-22 and miR-29a. To determine whether these changes are heart specific or represent a systemic hallmark of ageing, we also evaluated their expression in multiple organs collected from young and aged mice. The results showed that only miR-21a and miR-29a were

globally increased in ageing, and very interesting the expression level of miR-29a was higher that of miR-21a (Fig. 1B).

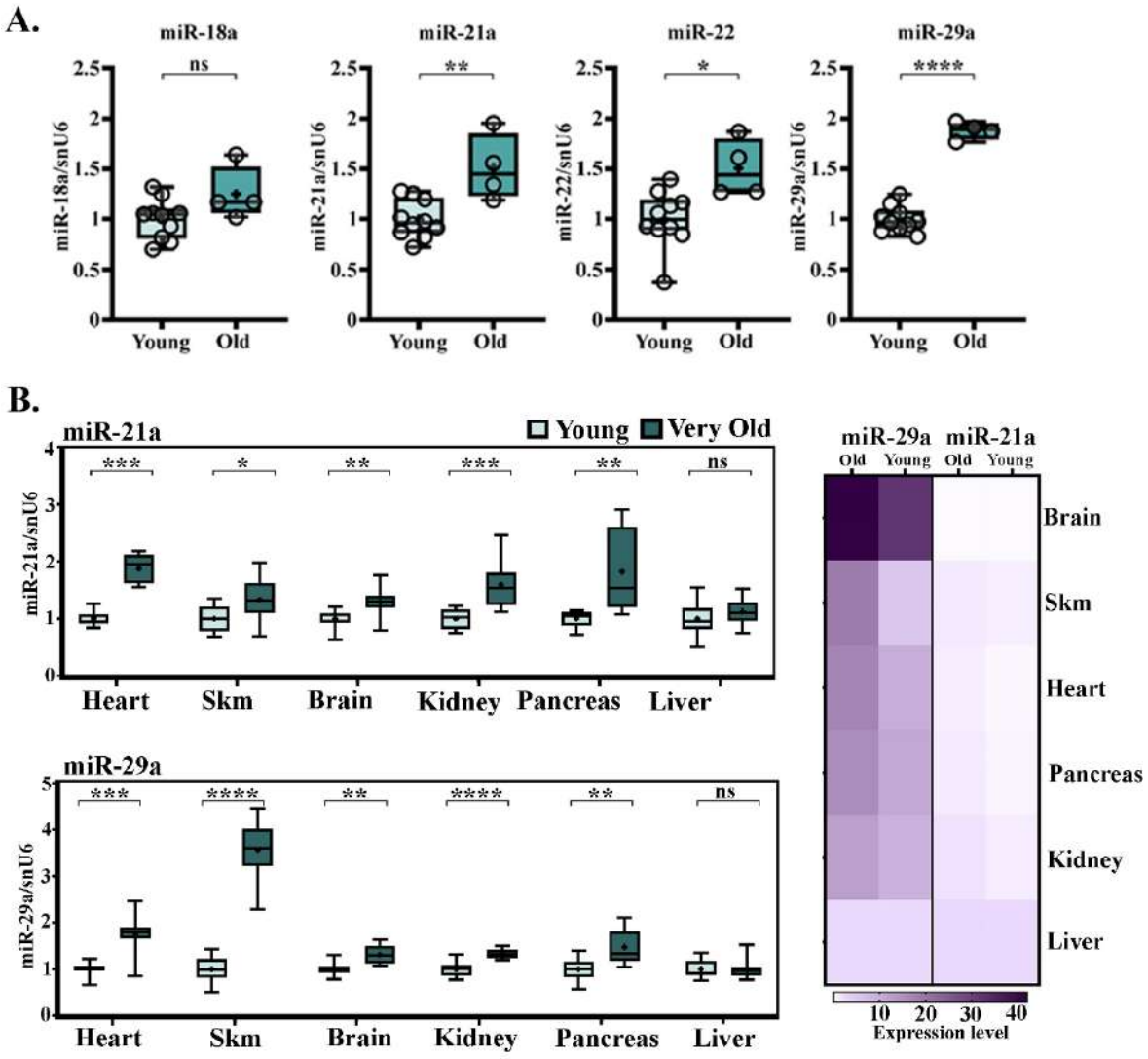


Figure 1. The evaluation of miRNAs involved in cardiac pathologies during natural ageing. (*A.) Evaluation of four miRNAs in the heart collected from young and aged mice; (B.) Assessment of miR-21a and miR-29a expression levels in multiple organs harvested from young and aged mice. The heatmap shows a higher expression of miR-29a compared to miR-21 across the analysed organs. Data are presented as 2-dCt values, with snU6 used*

These findings suggests that miR-29a might play a more important biological role in the ageing process, which prompted further studies focused on elucidating its function during ageing. Bioinformatic analysis revealed that miR-29a directly regulates *Extracellular matrix organization* by targeting *Serpinh1*, an essential collagen chaperone (Fig. 2A-B). Experimental validations confirmed *Serpinh1* as a direct target of miR-29a, and its

expression level was found negatively correlated with the elevated levels of miR-29a observed in aged organs (Fig. 2C).

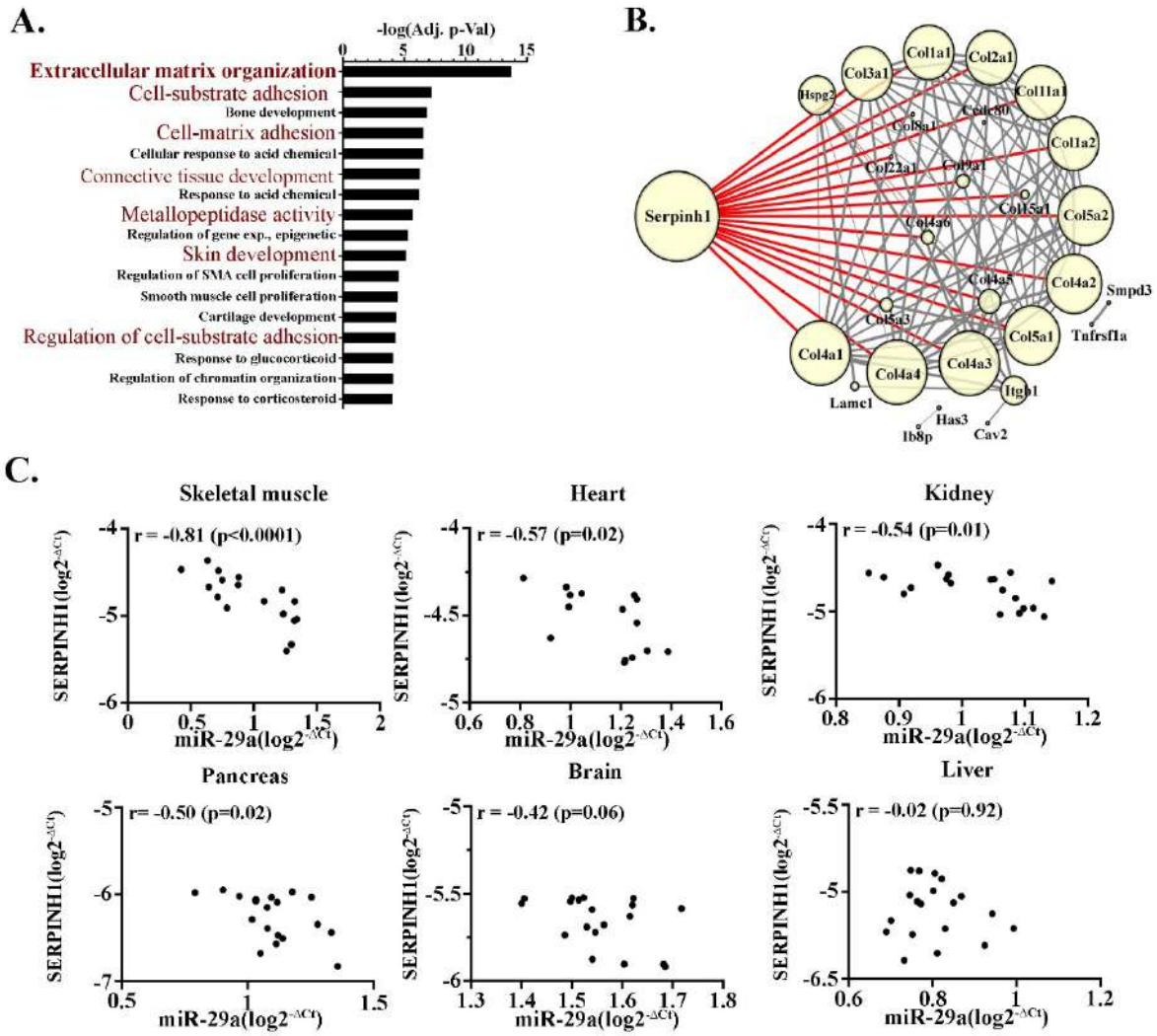


Figure 2. Identification of Serpinh1 as a target of miR-29a*. (A.) Bioinformatic analysis of biological processes deregulated by miR-29a; (B.) Protein-protein interaction (PPI) analysis identifying Serpinh1 as a central player in "ECM Organisation"; (C.) Pearson correlations between Serpinh1 and miR-29a expression levels as across six analysed organs;*

Finally, in vitro studies demonstrated that overexpression of miR-29a in fibroblasts and cardiac muscle cells inhibited cell proliferation and migration (Fig. 3A), and reduce the synthesis of pro-fibrotic molecules such as Collagen 1 and 3 (Fig. 3B). These findings suggest that miR-29a acts as a compensatory anti-fibrotic mechanism, capable of limiting pathological remodelling of the extracellular matrix.

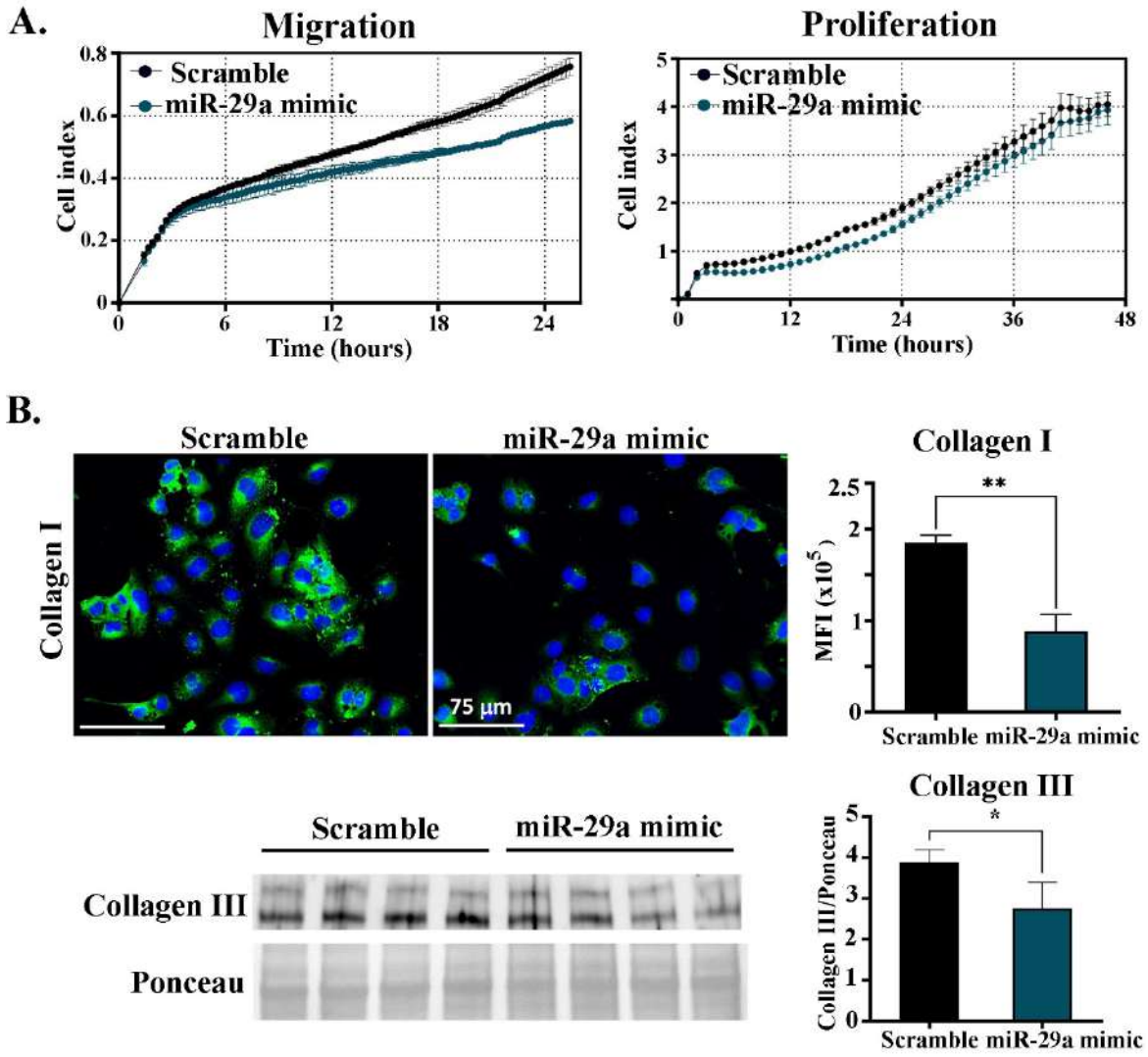


Figure 3. The antifibrotic role of miR-29a*. (A.) Real-time assessment of migration and proliferation in HL-1 cells following transfection with either a miR-29a mimic or scrambled miRNA control. Data represent one representative experiment out of three performed in quadruplicate with similar results; (B.) Quantification of collagen in HL-1 cells overexpressing miR-29a.*

Chapter 2-INVESTIGATION OF MIRNAs WITH REDUCED EXPRESSION IN CARDIAC FIBROBLASTS DURING NATURAL AGEING, comprises two studies:

Study 1 *–"Isolation and characterization of primary murine fibroblasts and cardiomyocytes"* aimed to obtain the highest number of viable and functional cardiac cells. Adult murine cardiomyocytes were isolated from young and old mice by retrograde perfusion through the aorta with a digestion buffer, which insured the uniform distribution of digestive enzymes through the coronary network, enabling an efficient digestion of

myocardial tissue. The isolated cells displayed typical rectangular morphology, being elongated and in some cases, branched (Fig. 4). To isolate cardiac fibroblasts, three enzymatic digestion protocols using different enzymes were standardized. Comparison of the three protocols revealed that fractionated digestion provided the best balance between yield, viability and cellular purity, allowing the reproducible isolation of a substantial number of cardiac fibroblasts. The fibroblasts exhibited typical mesenchymal morphology, with spindle-shaped or stellate forms.

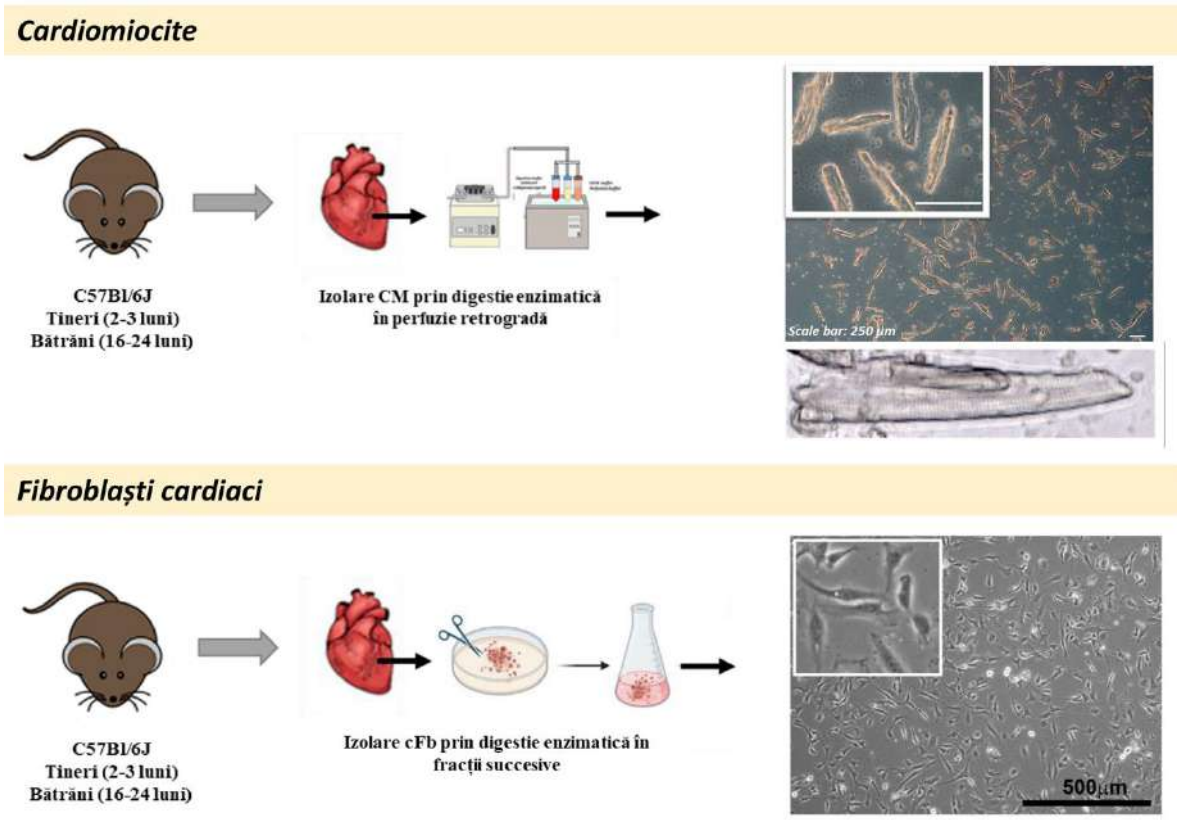


Figure 4. Isolation of cardiac cells*. Schematic illustrations of the experimental design for cardiomyocytes and cardiac fibroblast isolation. Representative images of cardiomyocytes after 1h in culture and cardiac fibroblast after 3 days in culture.*

Immunophenotypic characterization of cardiac fibroblasts by flow cytometry show that the cell suspension was depleted of CD45+ immune cells and CD31+ endothelial cells, while the majority of cells expressed Pdgfr-alpha, S100A4 and alpha-SMA, a well-established panel of cardiac fibroblast markers. Comparative analysis of fibroblast isolated from young and old mice reveal that the age associated phenotypic changes were moderate, but significant at the cellular level. Specifically, fibroblasts from old animals exhibited a slight increase in cell size (Fig. 5A), reorganisation of alpha-SMA (Fig. 5B) and a greater reliance

on glycolytic metabolism associated with a reduced adaptability to metabolic stress (Fig. 5C).

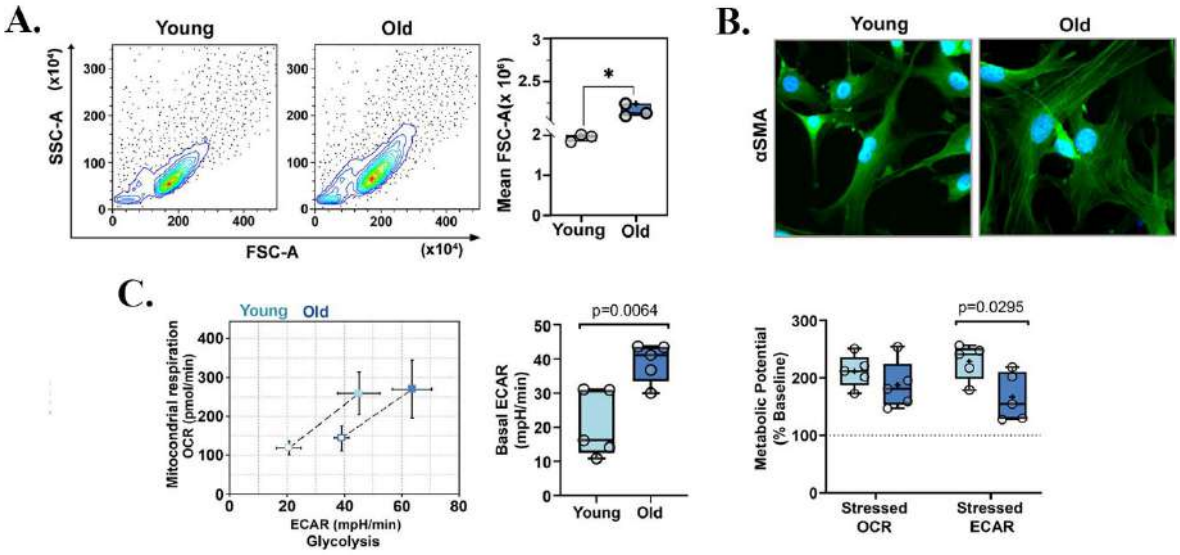


Figure 5. Differences in cardiac fibroblast derived from young and old mice. *(A.) Scatter plot showing the size of cardiac fibroblast from young and old mice; (B.) Fluorescence microscopy images showing differences in the distribution pattern of alpha-SMA protein (The pictures are representative from three experiments); (C.) Metabolic differences between young and old fibroblast under basal and stress conditions.*

Study 2-*"* MiRNAs generated from Meg3-Mirg locus are downregulated during aging". In this study, we demonstrated that natural ageing in cardiac fibroblast was associated with moderate changes in the expression of 88 miRNA, of which 60 show significant downregulation (Fig. 6A). To identify those miRNAs with significantly altered expression that may reliably reflect ageing-associated changes we map their genomic position and the frequency of steady, upregulated and downregulated miRNAs were interrogated for each chromosome. The results reveal that among the 60 downregulated miRNAs, 30 originated from the Meg3-Mirg locus on chromosome 12 (Fig. 6B). This locus consists exclusively of non-coding RNAs, i.e. 3 long-noncoding RNAs (Meg3, Rian, Mirg), several small nucleolar RNAs (C/D snoRNAs) and 57 miRNA genes (Fig. 6C).

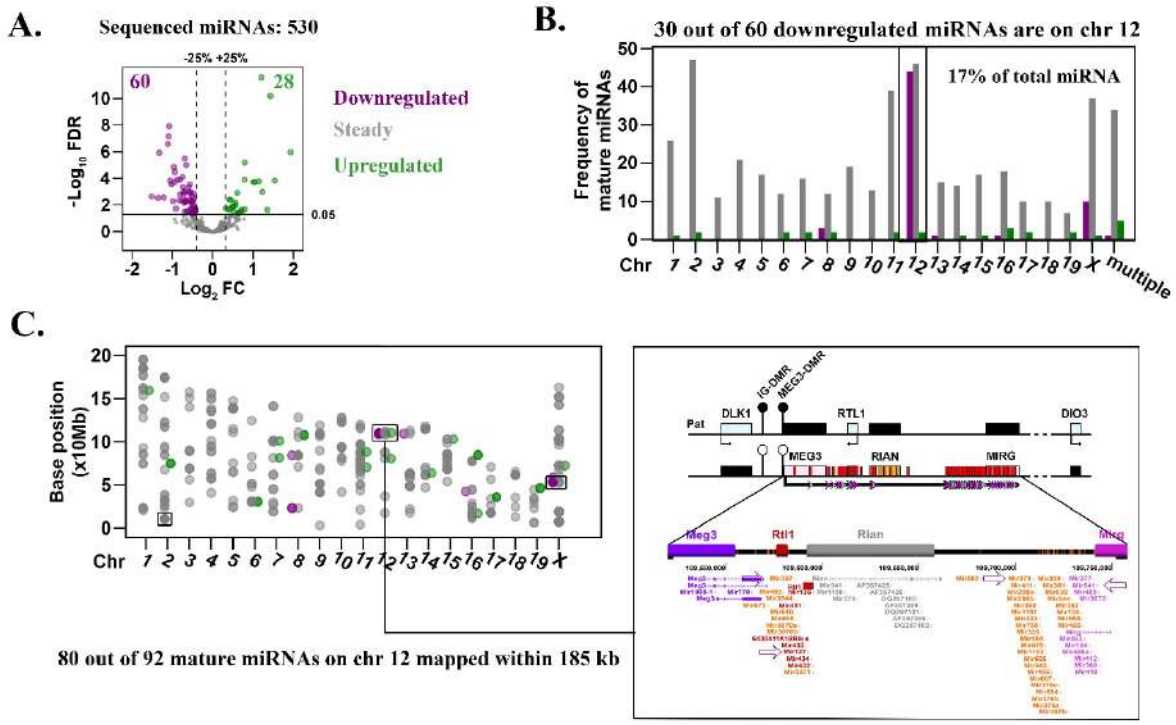


Figure 6. Identification of miRNAs in cardiac fibroblast isolated from young and old mice. *(A.) Volcano plot showing the analysis of differentially expressed miRNA; (B.) The frequency of mature miRNAs mapped to each mouse chromosome or to multiple chromosomes; (C.) The genomic location of mature miRNAs represented by the position at which the corresponding gene begins (mature miRNAs with multiple genomic locations were not showed) and schematic representation of the Meg3-Mirg locus as part of the paternally imprinted Dlk1-Dio3 locus. The Meg3-Mirg locus is maternally expressed and contain exclusively non-coding RNAs, namely lncRNAs (Meg3, Rian, Mirg), several snoRNAs (orange bar) and 57 miRNA genes (red bars). Representative miRNAs from the Meg3-Mirg cluster are highlighted with arrows.*

To determine whether the ageing associated downregulation of miARNs from the Meg3-Mirg locus is a feature specific to cardiac fibroblasts or also affected other organs or cardiac cell types, we selected four mature miARNs (miR-337-5p, miR-127-3p, miR-379-5p, miR-541-5p) as representative of the locus. These miARNs were chosen based on their genomic positions across the cluster and their consistent expression levels. The results demonstrated that natural ageing is associated with a coordinated repression of these four representative miRNAs (miR-337-5p, miR-127-3p, miR-379-5p, miR-541-5p), a phenomenon observed not only in cardiac fibroblasts, but also in other organs such as skeletal muscle, liver and cardiac ventricles (Fig.7).

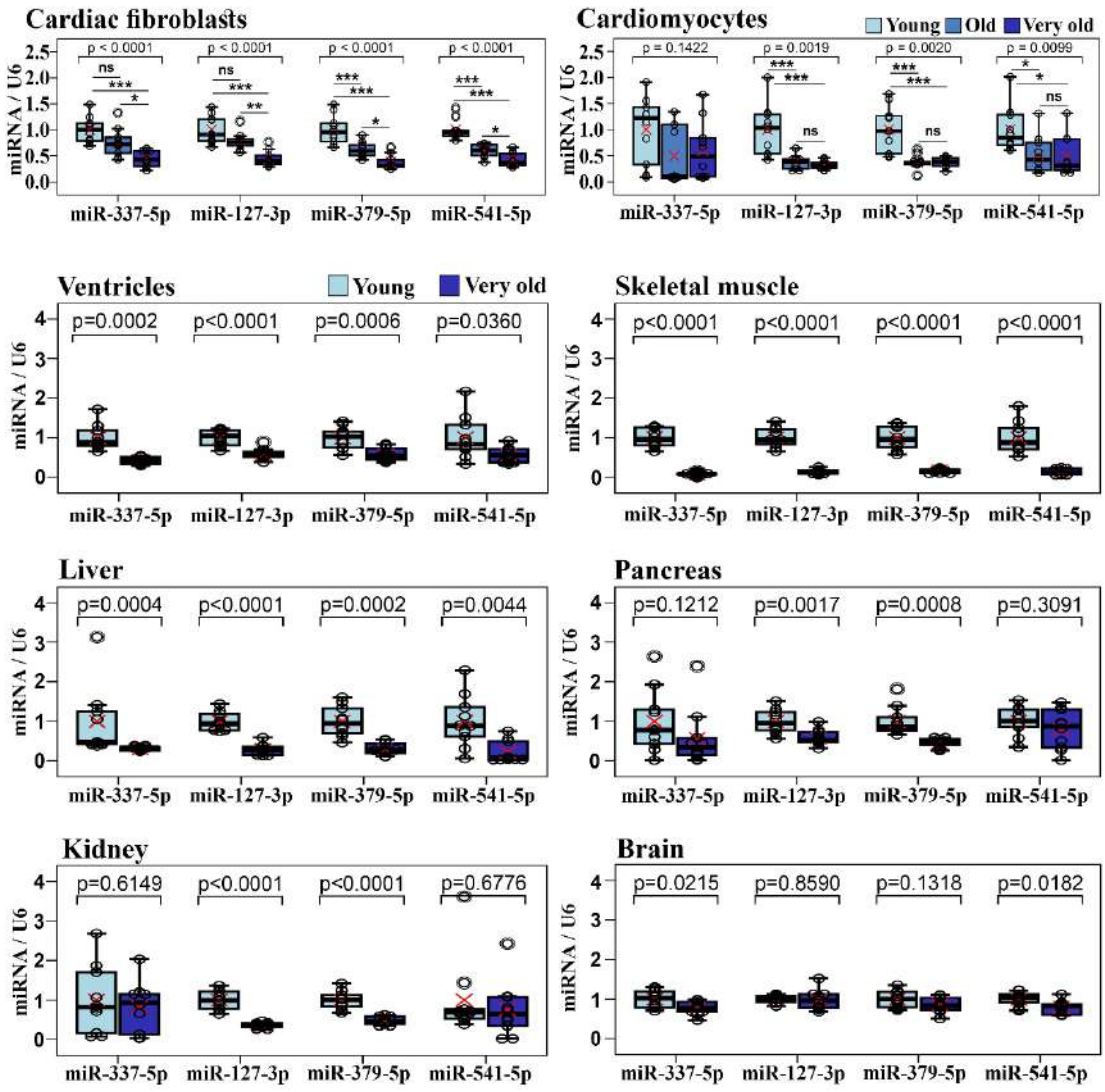


Figure 7. RT-qPCR Analysis of the four representative miRNAs from the Meg3-Mirg locus in cardiac cells and multiple organs collected from young and old mice. *For each miARN, the expression level is shown relative to the young group; n=8-10/group. Data are represented as mean* $2^{-\Delta\Delta Cq}$ *values, ± SD.*

Subsequently to determine the biological role of the downregulation of miRNAs from the Meg3-Mirg locus, 27 representatives of this locus were included in an in silico analysis to identify their predicted target genes. Bioinformatic analysis revealed that the predicted targets of all miRNAs were significantly enriched in KEGG pathways related to longevity, inflammation and fibrosis, suggesting a central role of this locus in regulated age-associated processes (Fig. 8A). Furthermore, by intersecting the target genes of the 27 miRNAs with the genes unregulated during ageing from the Tabula Muris Senis data set, we identify and validated Itgb2 (Fig. 8B-C) as a relevant target gene of Meg3-Mirg miRNAs, and found it

to be overexpressed in several aged organs (heart, brain, kidney pancreas and cardiac fibroblast).

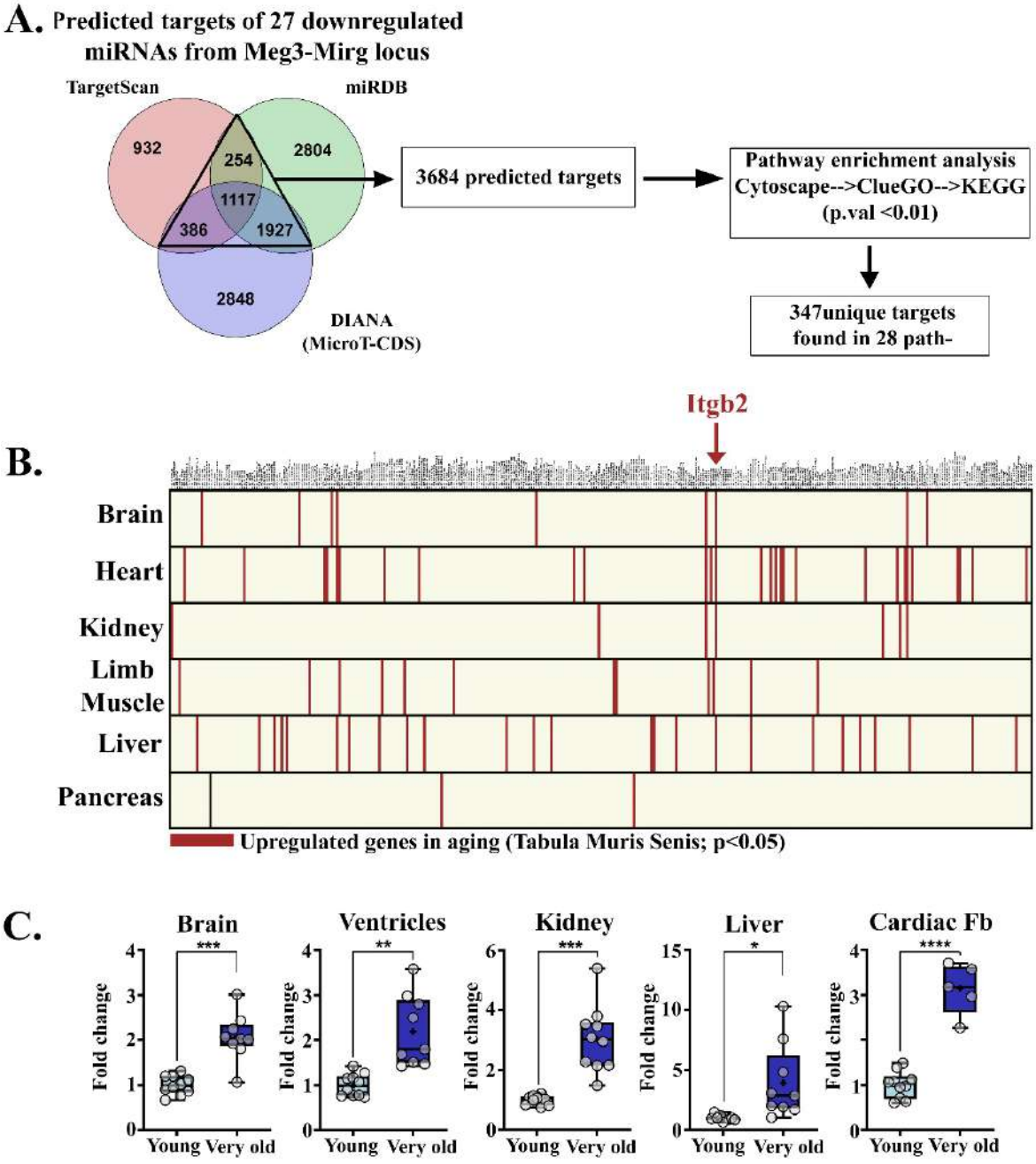


Figure 8. Gene upregulated during ageing that are targeted by the miRNAs from the Meg3-Mirg locus. *(A.) Venn diagram illustrating the predicted targets of 27 miRNAs; (B.) Graphical representation of the intersection between the unique gene identified in KEGG pathways and the genes that are upregulated in the Tabula Muris Senis database. Upregulated genes are highlighted for each organ. Itgb2 was identified as the only gene*

upregulated in 4 out of 6 organs; (C.) The expression Itgb2 gene in the brain, ventricles, kidney, liver and cultured cardiac fibroblasts.

Chapter 3 - INVESTIGATION OF MIRNAs WITH INCREASED EXPRESSION IN CARDIAC FIBROBLASTS DURING NATURAL AGEING. This chapter includes the study "*Activation of miR-10b in cardiac fibroblasts attenuates the adverse remodelling after myocardial infarction during aging by targeting Lpar2*". In this study, we focused on identifying the roles of the upregulated miRNAs in cardiac fibroblasts, in the process of post-MI remodelling during ageing. Using in vivo functional studies, molecular biology techniques, biochemistry, cloning and cell culture experiments, we identified miR-10b-5p as being overexpressed in cardiac fibroblasts (cFbs) during ageing (Fig.9A). The increase was also confirmed in the aged heart and was attributed exclusively to the accumulation of miR-10b in cardiac fibroblasts, and not in cardiomyocytes, suggesting an important role for this miRNA in the fibrotic remodelling process associated with ageing (Fig.9B).

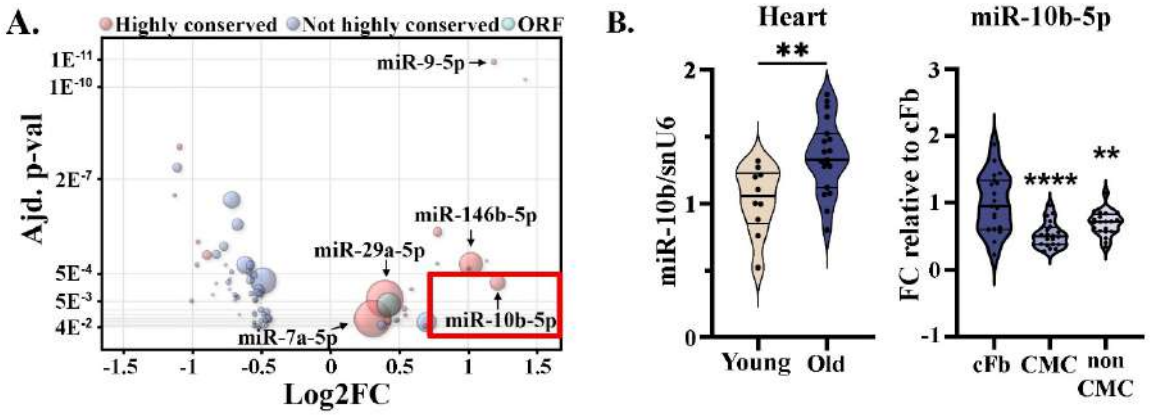


Figure9. Dysregulation of miR-10b expression during cardiac ageing. *(A.) Volcano bubble plot showing the dysregulated miRNAs in cardiac fibroblasts during ageing. Bubble size represents the mean expression level (RPM-reeds per million), while the colour indicates the conservation status: red= highly conserved (across vertebrates); blue= conserved only in mammals; (B.) Relative expression of miR-10b in the heart and isolated cardiac cells from young and old mice. N=10-20/group. Data are presented as mean* $2^{-\Delta\Delta Cq}$ *values ± SD.*

Thus, we hypothesized that miR-10b expression might also be altered in post-MI cardiac fibrosis. Our data showed that miR-10b exhibited a biphasic regulation during myocardial infarction being reduced during the inflammatory phase (1-3 days post-MI) and increased during the reparative/maturation phase (7-14 days post- MI) (Fig.10A-B). We showed that inflammatory signals such as TNF-alpha inhibited its expressions, thereby facilitating

fibroblast activation and matrix deposition. In contrast, increased levels of miR-10b in the presence of inflammatory stimuli promoted fibroblast apoptosis (Fig.10C). Furthermore, we demonstrated that in vitro overexpression of miR-10b in cardiac fibroblasts exerts an anti-fibrotic role by inhibiting their proliferation end migration and by reducing ECM molecules, such as *Ctgf* (Fig.10D-E). Collectively, these miR-10b - mediated processes may contribute to stabilising the post-MI scar and preventing excessive ECM accumulation.

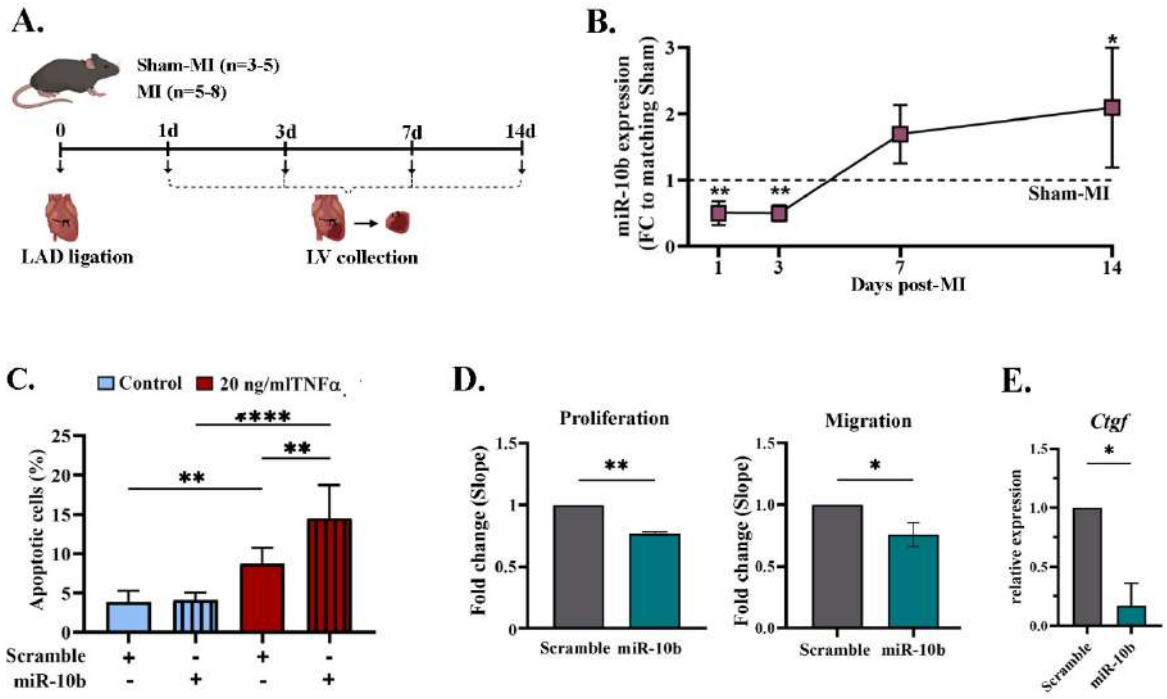


Figure10. The expressions and role of miR-10b during post-MI reparative phases. *(A.) Schematic representation of the experimental design. Myocardial infarction was induced in young C57Bl/6 mice (2-3 months) by ligation of the left anterior descending coronary artery (LAD). The infected region on the left ventricle was collected in liquid nitrogen at 1,3,7 and 14 days pos-MI; (B.) miR-10b expression at different time intervals after MI. Data are calculated relative to the corresponding Sham group at each collection time point (mean ±SD; n=3-9); (C.) The impact of miR-10b overexpression in 3T3 fibroblasts on cell apoptosis under inflammatory conditions; (D.) The effect of miR-10b on proliferation and migration of cardiac fibroblasts using the xCELLigence RTCA Biosensor system. Bar plots shows slope analysis describing the inclination, gradient and rate of change of the cell index curves measured over time. Three independent experiments were performed and slope results for each experiment were normalized to 1; (E.) Evaluation of Ctgf expression following miR-10b transfection in immortalized aged cardiac fibroblasts.*

To validate this hypothesis, we assessed the contribution of miR-10b in post-MI ventricular remodelling. For this purpose, we investigated the underlying mechanisms through which this miRNA influences ischemia-induced ventricular remodelling during aging. The results showed that miR-10b was upregulated in cardiac fibroblasts isolated 7 days post-MI from the infarcted region (Fig11A). Bioinformatic analysis and functional assays further identified Lpar2 as a direct target of miR-10b (Fig.11B). Accordingly, overexpression of miR-10b in aged cardiac fibroblasts reduced Lpar2 at both the transcript and protein level (Fig.11C), and luciferase reporter assays confirmed the direct miR-10b-Lpar2 interaction (Fig.11D). To further elucidate the molecular mechanisms by which the LPA/Lpar2-miR-10b axis regulates cardiac fibrosis, we explored the role of lysophosphatidic acid (LPA) in this process. LPA is a bioactive phospholipid with growth factor-like properties, known to stimulate cell proliferation, migration and survival. Moreover, LPA signalling, mediated through its receptors (Lparl-6), plays a significant role in the development of fibrosis.

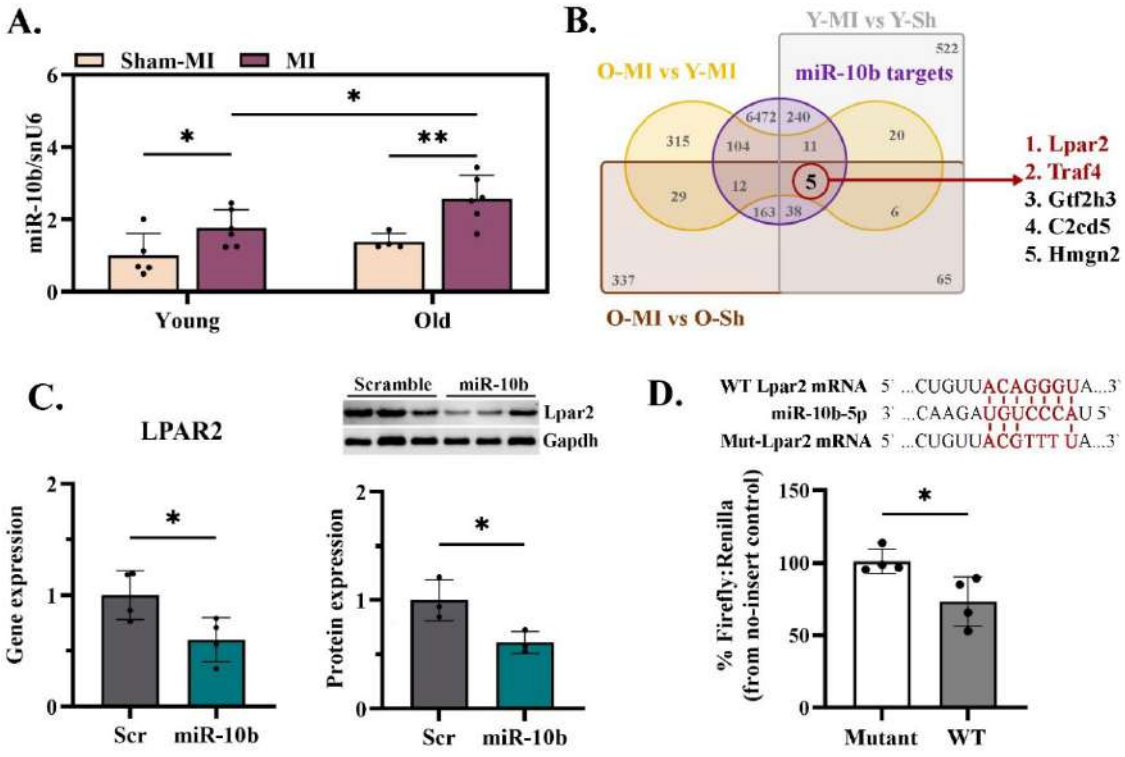


Figure11.Identification and validation of Lpar2 as a target of miR-10b. *(A.) RT-qPCR analysis of miR-10b expression in cardiac fibroblasts isolated from young and old mice 7 days post-MI; (B.) Bioinformatic analysis to identify target genes of miR-10b. The genes found downregulated in the experimental groups Y-MI vs Y-Sham, O-MI vs O-Sham and O-MI vs Y-MI were overlapped with the predicted miR-10b targets identified from four databases; (C.) Gene and protein expression of Lpar2 in old cardiac fibroblasts*

overexpressing miR-10b; (D.) Dual-luciferase reporter assay demonstrating the direct interaction between Lpar2 and miR-10b-5p. The pmiRGLO reporter plasmid containing the seed sequence of the Lpar2-WT or Lpar 2-Mut was co-transfected with miR-10b into HEK293 cells.

Functional essays showed that in the presence of a specific Lpar2 agonist, miR-10b overexpression reduced both proliferation (Fig.12A) and the expression of Collagen I and III genes (Fig.12B) in aged cardiac fibroblasts, further supporting the role of this pathway in fibrosis.

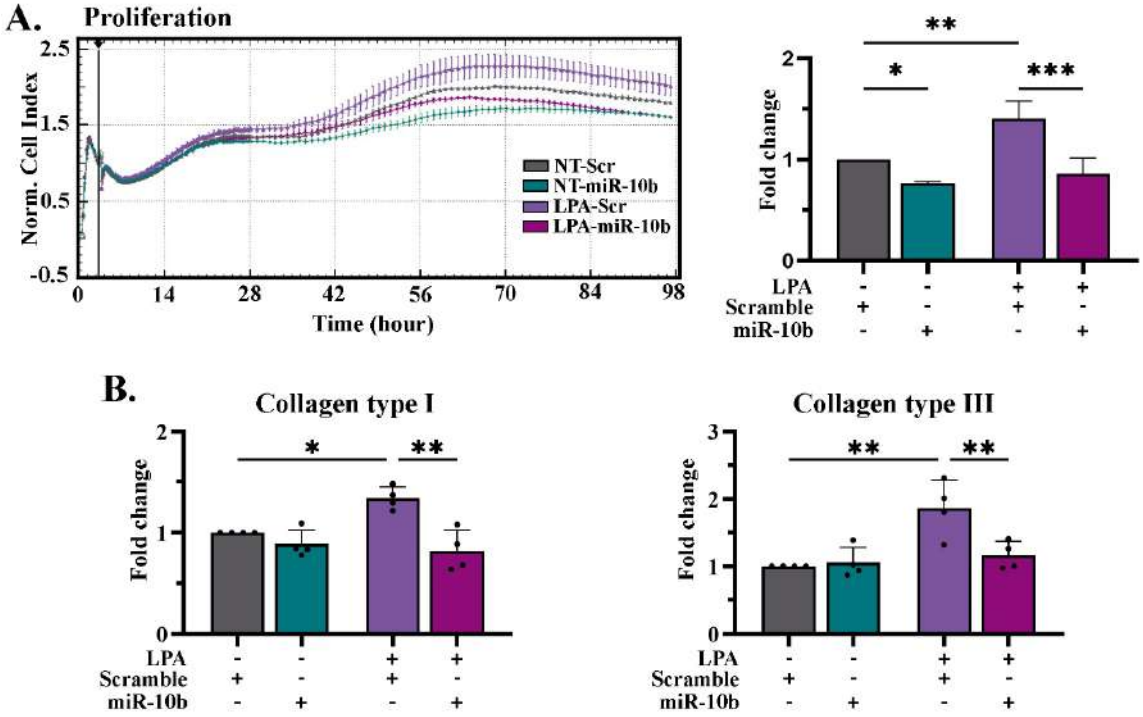


Figure 12. The role of the miR-10b/Lpar2 axis in the fibrotic process. *(A.) Cells were transfected with miR-10b or Scramble for 24 hours and subsequently exposed to the LPA2 agonist for 98 hours. The left plot shows the normalised cell index, represented as mean± SD of two or three individual wells from a representative experiment. The right graph quantifies the slope of proliferation curves from three independent experiments, describing the gradient and rate of change of the cell index curves over the 98 hours treatment period. Results are reported relative to the Scramble control for each experiment; (B.) Relative quantification of Collagen I and III genes in immortalised aged cardiac fibroblasts overexpressing miR-10b after 48 hours of treatment with the LPA2 agonist.*

Finally, we demonstrated that in vivo inhibition of miR-10b using an antagomir (Fig.13A-B) exacerbated the adverse remodelling post-MI in aged mice, leading to significant structural changes in the left ventricle (LV). Specifically, an increase in LV area and diameter was observed, along with the reduction in the anterior wall thickness in both systole and diastole. In addition, both end-diastolic and end-systolic volumes were increased is the anti-10b group (Fig.13C). These results showed that miR-10b inhibition exacerbates the adverse cardiac remodelling after myocardial infarction, manifested primarily by ventricular dilation and define the miR-10b-Lpar2 axis as a critical regulatory mechanism of fibroblast proliferation and extracellular matrix deposition in ageing, with potential for therapeutic exploitation.

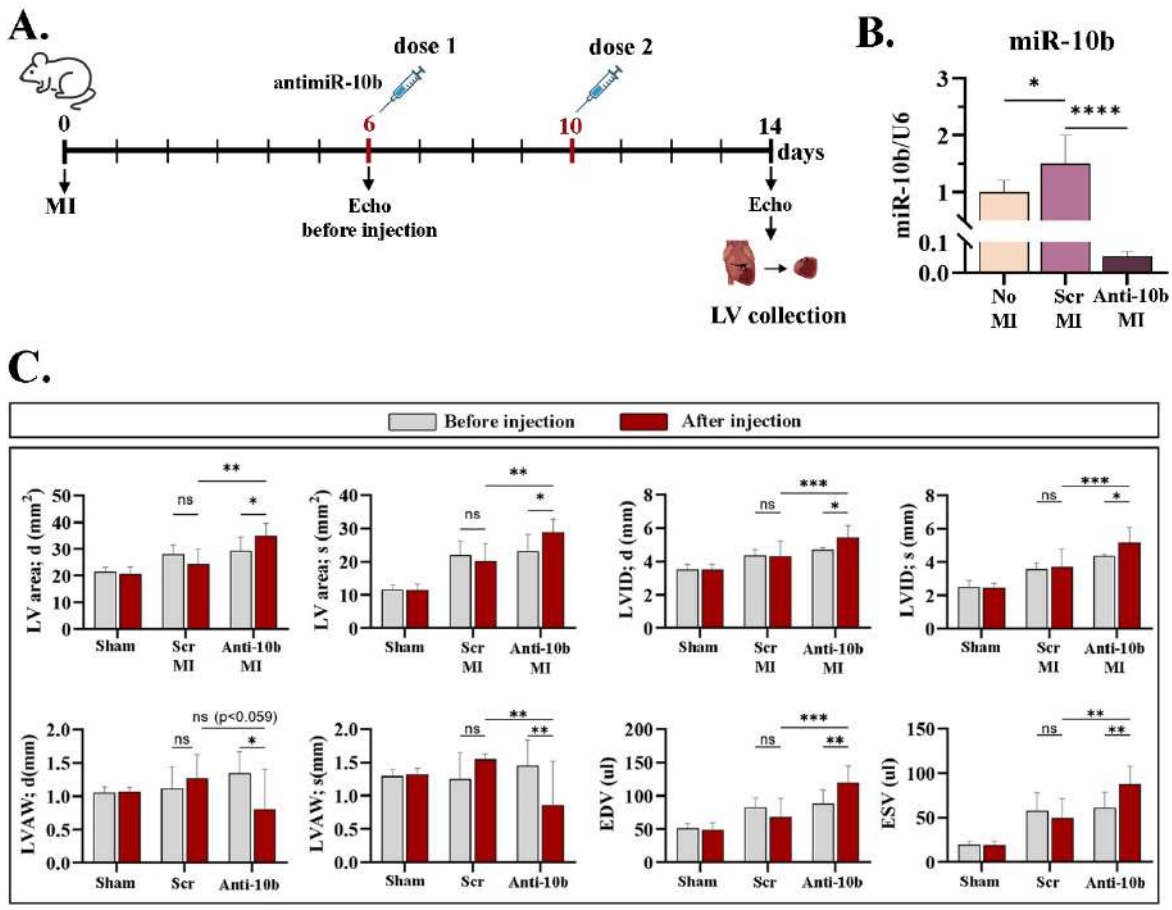


Figure 13. In vivo inhibition of miR-10b after MI. *(A.) Pictogram illustrating the experimental design. Aged C57Bl/6 mice (17-18 months) underwent either Sham or MI induction surgery. A dose of 10 mg/kg Scramble (Scr) or AntagomirR-10b (Anti-10b) was administered to the MI group after 6- and 10-days post-procedure; (B.) The expression level of miR-10b in the left ventricle after myocardial infarction; (C.) Measurements of LV area, LV internal diameter (LVID), LV anterior wall thickness (LVAW) and end-systolic (ESV)*

and end-diastolic (EDV) volumes over a cardiac cycle. Measurements were performed before the first dose of treatment and at the end point of the experiment (after injection).

Original contributions of the thesis

- Standardisation of the protocols for the isolation of adult murine, cardiac fibroblasts and cardiomyocytes for in vitro studies;
- We demonstrated that cardiac fibroblasts from aged heart has a frailty phenotype characterised by stress fibre reorganisation and metabolic changes with a shift towards glycolysis and loss of energetic flexibility under stress conditions;
- We identify and characterise the miRNAs expression profiles in cardiac fibroblasts isolated from young and old mice;
- We identify miR-29a as a globally upregulated miRNA during ageing, exerting a compensatory role with anti-fibrotic effects in this process;
- We demonstrated that miR-10b is increased in the aged male heart due to its overexpression in cardiac fibroblasts, and not in cardiomyocytes;
- We identify a temporal regulation of. miR-10b, with its expression reduced during post-MI inflammatory phase and increased during the reparative and scar maturation phase;
- We demonstrated that the exposure of cardiac fibroblasts to inflammatory stimuli, such as TNF-alpha decreased its expression, while its overexpression under the same conditions promoted cellular apoptosis;
- We demonstrated that miR-10b has an anti-fibrotic role under basal conditions in cardiac fibroblasts by reducing proliferation, migration and *Ctgf* expression;
- We demonstrated that the activation of Lpar2 receptor using an LPA2 agonist is inhibited by miR-10b overexpression in cardiac fibroblasts, leading to reduced cell proliferation and decreased expression of profibrotic genes such as Collagen I and Collagen III, thereby validating the anti-fibrotic role of miR-10b;
- We demonstrated that in vivo inhibition of after MI exacerbates fibrotic remodelling during ageing.

References

(1) Biernacka, A. & Frangogiannis, N. G. 2011. *Aging and cardiac fibrosis*. Aging Dis, 2, 158–173.

(2) Dai, D. F., Chen, T., Johnson, S. C., Szeto, H. & Rabinovitch, P. S. 2012. *Cardiac aging: from molecular mechanisms to significance in human health and disease*. Antioxid Redox Signal, 16, 1492–526.

(3) Daseke, M. J., 2nd, Tenkorang, M. A. A., Chalise, U., Konfrst, S. R. & Lindsey, M. L. 2020. *Cardiac fibroblast activation during myocardial infarction wound healing: fibroblast polarization after mi*. Matrix Biol, 91-92, 109–116.

(4) Deb, A. & Ubil, E. 2014. *Cardiac fibroblast in development and wound healing*. J Mol Cell Cardiol, 70, 47–55.

(5) Ferrucci, L. & Fabbri, E. 2018. *Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty.* Nat Rev Cardiol, 15, 505–522.

(6) Gupta, S. K., Piccoli, M. T. & Thum, T. 2014. *Non-coding rnas in cardiovascular ageing.* Ageing Res Rev, 17, 79–85.

(7) https://heartreport23.world-heart-federation.org/, accesat august 2024

(8) Lähteenvuo, J. & Rosenzweig, A. 2012. *Effects of aging on angiogenesis*. Circ Res, 110, 1252–64.

(9) North, B. J. & Sinclair, D. A. 2012. *The Intersection Between Aging And Cardiovascular Disease*. Circ Res, 110, 1097–108.

(10) Olivetti, G., Cigola, E., Maestri, R., Lagrasta, C., Corradi, D. & Quaini, F. 2000. *Recent advances in cardiac hypertrophy*. Cardiovasc Res, 45, 68–75.

(11) Olivetti, G., Melissari, M., Capasso, J. M. & Anversa, P. 1991. *Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy*. Circ Res, 68, 1560–8.

(12) Seyhan, A. A. 2024. *Trials and tribulations of microrna therapeutics*. Int J Mol Sci, 25.

(13) Singam, N. S. V., Fine, C. & Fleg, J. L. 2020. *Cardiac changes associated with vascular aging*. Clin Cardiol, 43, 92–98.

(14) Smolgovsky, S., Ibeh, U., Tamayo, T. P. & Alcaide, P. 2021. *Adding insult to injury - inflammation at the heart of cardiac fibrosis*. Cell Signal, 77, 109828.

(15) Tallquist, M. D. & Molkentin, J. D. 2017. *Redefining the identity of cardiac fibroblasts*.

Nat Rev Cardiol, 14, 484–491.

(16) Theall, B. & Alcaide, P. 2022. *The heart under pressure: immune cells in fibrotic remodeling*. Curr Opin Physiol, 25.

(17) Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., Castoldi, M., Soutschek, J., Koteliansky, V., Rosenwald, A., Basson, M. A., Licht, J. D., Pena, J. T., Rouhanifard, S. H., Muckenthaler, M. U., Tuschl, T., Martin, G. R., Bauersachs, J. & Engelhardt, S. 2008. *Microrna-21 contributes to myocardial disease by stimulating map kinase signalling in fibroblasts*. Nature, 456, 980–4.

(18) Travers, J. G., Kamal, F. A., Robbins, J., Yutzey, K. E. & Blaxall, B. C. 2016. *Cardiac fibrosis: the fibroblast awakens*. Circ Res, 118, 1021–40.

(19) Van Rooij, E., Sutherland, L. B., Thatcher, J. E., Dimaio, J. M., Naseem, R. H., Marshall, W. S., Hill, J. A. & Olson, E. N. 2008. *Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of mir-29 in cardiac fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 105, 13027–32.

EFFECTIVENESS AND DISSEMINATION OF RESEARCH

Papers published in ISI journals- 2 as first author

1. **Rusu-Nastase EG**, Lupan AM, Marinescu CI, Neculachi CA, Preda MB, Burlacu A. *MiR-29a Increase in Aging May Function as a Compensatory Mechanism Against Cardiac Fibrosis Through SERPINH1 Downregulation*. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 2022 doi: 10.3389/fcvm.2021.810241. **Journal impact factor (2022): 3.6 (Q2)**
2. Lupan AM*, **Rusu EG***, Preda MB, Marinescu CI, Ivan C, Burlacu A. *miRNAs generated from Meg3-Mirg locus are downregulated during aging.* Aging (Albany NY), 2021, doi: 10.18632/aging.203208 (* equal contributions). **Journal impact factor (2021): 5.682 (Q1)**

Manuscript in preparation: **Rusu-Nastase EG**, Marinescu CI, Neculachi CA, Preda MB, Martelli F, Burlacu A. *MiR-10b activation in cardiac fibroblast attenuates the adverse cardiac remodelling after myocardial infarction during ageing by targeting Lpar2*.

Papers published in ISI journals – 5 as co-autor

1. Laudy Cherry, Sinziana Popescu,&, Carmen Alexandra Neculachi, **Evelyn-Gabriela Nastase-Rusu**, Catalina Iolanda Marinescu-Colan, Bogdan Paul Cosman, Letitia Ciortan, Fabio Martelli, Maya Simionescu, Elena Butoi, Alexandrina Burlacu, Mihai Bogdan Preda. *Mesenchymal stromal cells modulate neutrophil phenotype via paracrine signals*. Stem Cell Research & Therapy, 2025. **Journal impact factor (2024): 7.3 (Q1)**.

2. Neculachi CA, **Nastase-Rusu EG**, Cherry L, Marinescu-Colan CI, Tastsoglou S, Cosman BP, Popa AM, Panciuc C, Zaccagnini G, Catrina SB, Simionescu M, Martelli F, Preda MB, Burlacu A. *miR-210 promotes the anti-inflammatory phenotype and M2 polarization in murine macrophages*. Frontiers in Immunology. 2025; doi: 10.3389/fimmu.2025.1633163. **Journal impact factor (2024): 5.9 (Q1)**.
3. Preda MB, **Nastase-Rusu EG**, Neculachi CA, Zhong X, Voellenkle C, Mazure NM, Balacescu O, Ivan C, Zheng XW, Gherghiceanu M, Lebrigand K, Simionescu M, Martelli F, Mari B, Catrina SB, Burlacu A, Ivan M. *miR-210 locus deletion disrupts cellular homeostasis: an integrated genetic study*. Scientific Reports. 2025;15(1):22659. doi: 10.1038/s41598-025-07572-8. **Journal impact factor**

(2024): 3,9 (Q1).

4. Marinescu-Colan CI, **Nastase-Rusu EG**, Neculachi CA, Martelli F, Cherry L, Preda MB, Burlacu A. *From cancer to heart fibrosis - GLIPR1 highlights a subset of myofibroblasts responsive to mesenchymal stem cell therapy after myocardial infarction*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2025; doi: 10.1016/j.biopha.2025.118087. **Journal impact facto (2024): 7.5 (Q1)**.
5. Marinescu CI, Preda MB, Neculachi CA, **Rusu EG**, Popescu S, Burlacu A. *Identification of a Hematopoietic Cell Population Emerging From Mouse Bone Marrow With Proliferative Potential In Vitro and Immunomodulatory Capacity*. Frontiers in Immunology, 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.698070. **Journal impact factor (2021): 7,561(Q1)**
6. Preda MB, Lupan AM, Neculachi CA, Leti LI, Fenyo IM, Popescu S, **Rusu EG**, Marinescu CI, Simionescu M, Burlacu A. *Evidence of mesenchymal stromal cell adaptation to local microenvironment following subcutaneous transplantation*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020, doi: 10.1111/ jcmm.15717. **Journal impact factor (2020): 5.310 (Q2)**

Oral communications at international scientific conferences: 2 oral presentations

1. **Rusu Evelyn-Gabriela.** Oral presentation during the ”39th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology”. *Natural aging process is associated with increased miR-29a and downregulated SERPINH1 in multiple organs*, 21-23 October **2022**, Cluj, Romania- **awarded with „Best Presentation Award” in the *PhD Students Presentations*** session.
2. **Rusu Evelyn-Gabriela.** Oral presentation during the”38th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology”. *MiRNAs generated from Meg3-Mirg locus are downregulated during aging*, 4-6 November **2021**, Bucharest, Romania.

Posters presented at international scientific conferences: 5 posters

1. **Rusu E.G.,** Burlacu A. *Evaluation of the imact of alginate-based scaffolds on the mesenchymal stem cell properties in vitro*, presented at ”The 10th National Congress with International Participation and 36th Annual Scientific Session of RSCB”, 5-9 June **2018**, Craiova, Romania.
2. **Rusu E.G.,** Lupan A.M, Marinescu C.I, Preda B.M, Burlacu A. *Influence of aging on the quality and dynamics of mouse cardiac fibroblasts in culture* presented at the” European Research Area Network (ERA-Net) on Cardiovascular Diseases

(ERA-CVD) meeting", 13-15 May **2019**, Riga, Latvia.

3. **Rusu E.G.,** Lupan A.M, Marinescu C.I, Preda B.M, Burlacu A. *Influence of aging on the quality and dynamics of mouse cardiac fibroblasts in culture* presented at the" International Cell Culture Under Flow Meeting 2020", 18-19 February **2020**, Munich, Germany. **Poster presentation awarded with the „Young Scientist Award".**
4. **Rusu E.G.,** Lupan A.M, Marinescu C.I, Preda B.M, Burlacu A. *MiRNAs generated from Meg3-Mirg locus are downregulated during aging. 2nd Olympiad in Cardiovascular Medicine* presented at the" International Symposium on Experimental and Clinical Cardiology", 27-30 April **2022**, Heraklion, Crete
5. **Rusu E.G.,** Lupan A.M, Preda B.M, Marinescu C.I, Neculachi C.A, Burlacu A. *Natural aging process is associated with increased miR-29a and downregulated Serpinh1 in multiple organs* presented at the "Final CardioRNA COST Action Meeting", 22-24 April **2023**, Nicosia, Cyprus.

Specialisations and courses completed during the doctoral programme

1. "CardioRNA Bioinformatics Training School" organized by COST CA17129 "CardioRNA", Nicosia, Cyprus, 20-22 February 2023.
2. "10th International Course: Care and use of laboratory animals (Mice, Rats, Zebrafish)" Crete, Greece, 17 April-7 June 2024.

Awards

1. **" Young Scientist Award"** for the poster: **Rusu E.G.,** Lupan A.M, Marinescu C.I, Preda B.M, Burlacu A. *Influence of aging on the quality and dynamics of mouse cardiac fibroblasts in culture*, presented during" International Cell Culture Under Flow Meeting 2020", 18-19 February **2020**, **Munich, Germany**
2. **" Best Presentation Award"** for the oral presentation: **Rusu Evelyn-Gabriela.** *Natural aging process is associated with increased miR-29a and downregulated SERPINH1 in multiple organs*, presented during "39th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology", 21-23 October **2022**, **Cluj, Romania.**

RESEARCH FUNDING AND COLLABORATIONS IN RESEARCH PROJECTS

1. **PhD fellowship**: Romanian Academy (SCOSAAR): 2018-2021 (contract nr 88/04.11.2018)
2. **PNRR-III-C9-2022-I8-186 - "***Targeting Cardiac Fibrosis in Heart Failure; Challenges and Potential Solutions Based on ncRNA Therapeutics* (FibroThera)", project ladder Dr. Fabio Martelli, Scientific Director, Laboratory of Molecular Cardiology, I.R.C.C.S. Policlinico San Donato
3. **PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0172 -** "*Targeting innate immune mechanisms to improve risk stratification and to identify future therapeutic options in myocardial infarction*" (INNATE-MI), project ladder Acad. Maya Simionescu (ollaborator in the project implementation team in 2022)
4. **PN-III-P4-ID-PCE-2020-1340 - "***Fundamental mechanisms of ventricular remodelling evaluated in cardiac fibroblast population in the age myocardium with infarction* (Inf-OLD)", project leader Dr. Alexandrina Burlacu
5. **PN-III-P1-1.1-TE-2019-1893** - " MiR-*210 genomic locus. and the overlap between hypoxia signalling and inflammatory networks*" (210-HINT), project leader Dr. Bogdan Preda
6. **COFUND-ERA-CVD-EXPERT-65/2017** - "*Exploring new pathways in age-related heart diseases*", ERA-CVD Joint Transnational Projects 2017-2020; (1) Hannover Medical School; (2) Maastricht University; (3) Humanitas Research Hospital; (4) Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III; (5) University of Lorraine; (6) Institute of Cellular Biology and Pathology (PI: Dr. Alexandrina Burlacu)
7. **POC-A.1-A.1.1.4-E-2015** – "*Improving institutional competitiveness in the field of type 1 diabetes through the development of an innovative mesenchymal stromal cells-based immunotherapy concept* (DIABETER)", project leader Dr. Nadir Askenasy (Frankel Laboratory for Experimental Bone Barrow Transplantation, Schneider Children's Medical Center of Israel). Internal scientific coordinator: Dr. Alexandrina Burlacu.

ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae Simionescu"

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Modificări ale celulelor cardiace determinate de expresia aberantă a unor miARN-uri asociate cu îmbătrânirea

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
Dr. ALEXANDRINA BURLACU

DOCTORAND:
EVELYN-GABRIELA NASTASE-RUSU

2025

CUPRINS

LISTA ABREVIERI **6**

INTRODUCERE **10**

PARTEA I- STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

I. ROLUL ÎMBĂTRÂNIRII ÎN APARIȚIA BOLILOR CARDIACE **17**

I.1 Caracteristici ale îmbătrânirii 17
I.2 Modificări cardiace asociate cu îmbătrânirea 23
I.3 Remodelarea cardiacă în miocardul bătrân cu boală cardiacă ischemică 34

II. FIBROBLASTUL CARDIAC **42**

II.1 Caracteristici generale 42
II.2 Fibroblastul cardiac în homeostazia cardiacă 46
II.3 Fibroblastul cardiac în fibroză 49

III. MICROARN ÎN ÎMBĂTRÂNIREA CARDIACĂ ȘI ÎN PATOLOGII ASOCIATE ÎMBĂTRÂNIRII **56**

III.1 Nomenclatura și organizarea genomică a microARN-urilor 58
III.2 Biogeneza moleculelor de miARN 60
III.3 Mecanismele de acțiune ale miARN-urilor 65
III.4 Dereglarea microARN-urilor în îmbătrânirea cardiacă și bolile cardiace asociate 67
III.5 MicroARN în terapia fibrozei cardiace 71

PARTEA II-CONTRIBUȚII ORIGINALE

I. MIARN IMPLICATE ÎN PROCESUL DE ÎMBĂTRÂNIRE NATURALĂ: IMPACTUL ASUPRA BOLILOR CARDIOVASCULARE **74**

Creșterea expresiei miR-29a în îmbătrânire ca un posibil mecanism compensator împotriva fibrozei cardiace prin reducerea nivelelor de Serpinh1 74
I.1 Introducere și obiective 74
I.2 Protocoale experimentale și metode de analiză 75
I.3 Rezultate 82
I.4 Discuții și concluzii 99

II. INVESTIGAREA UNOR MOLECULE DE MIARN CU EXPRESII SCĂZUTE ÎN FIBROBLAȘTII CARDIACI ÎN ÎMBĂTRÂNIREA NATURALĂ **106**

Introducere și obiective 106
II.1 Izolarea și caracterizarea fibroblaștilor și cardiomiocitelor murine **107**
II.1.1 Protocoale experimentale și metode de analiză 107
II.1.2 Rezultate 117
II.1.3 Discuții și concluzii 127

II.2 MiARN-urile generate de locusul Meg3-Mirg sunt scăzute în timpul îmbătrânirii

II.1.2 Rezultate 117
II.1.3 Discuții și concluzii 127

II.2 MiARN-urile generate de locusul Meg3-Mirg sunt scăzute în timpul îmbătrânirii naturale 128
II.2.1 Protocoale experimentale și metode de analiză 128
II.2.3 Rezultate 133
II.2.4 Discuții și concluzii 152

III. INVESTIGAREA UNOR MOLECULE DE MIARN CU EXPRESII CRESCUTE ÎN FIBROBLAȘTII CARDIACI ÎN ÎMBĂTRÂNIREA NATURALĂ 156
III.1 Introducere și obiective 156
III.2 Protocoale experimentale și metode de analiză 157
III.3 Rezultate 169
III.4 Discuții și concluzii 194

CONCLUZII GENERALE ALE TEZEI 202

BIBLIOGRAFIE 206

EFICIENȚA ȘI DISEMINAREA CERCETĂRILOR 239

FINANȚAREA CERCETĂRILOR ȘI COLABORĂRI ÎN PROIECTE DE CERCETARE 243

REZUMAT

Cuvinte cheie: Îmbătrânire; Fibroză cardiacă; miARN; Fibroblast; Infarct miocardic; Remodelare maladaptativă; Serpinh1; Lpar2

Număr total pagini – 243

Număr de figuri în partea I – 22

Număr de tabele în partea I – 0

Număr de figuri în partea a II-a – 68

Număr de tabele în partea a II-a – 4

Indicații bibliografice – 442

Lucrări publicate în reviste internaționale indexate ISI – 8 (2 autor principal)

Comunicări orale prezentate la manifestări științifice internaționale – 2 comunicări

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale – 5

Specializări și cursuri efectuate – 2

Premii – 2

Participarea în proiecte de cercetare – 7

Introducere și obiective

Creșterea longevității a stimulat interesul oamenilor de știință pentru înțelegerea mecanismelor fundamentale care stau la baza îmbătrânirii naturale. Îmbătrânirea este un fenomen extrem de complex și insuficient înțeles, care implică un declin treptat al funcțiilor la nivel celular și la nivelul organelor, conducând la o incidență crescută a bolilor cronice. Multe modificări genetice și epigenetice, precum și dezechilibre ale proceselor biochimice, sunt strâns legate de îmbătrânire, unele dintre acestea fiind recunoscute ca semne caracteristice ale acestui proces (Gupta et al., 2014). Potrivit raportului *Word Heart Report* din 2023, deși rata mortalității standardizate în funcție de vârstă a scăzut cu o treime între anii 1990 și 2019, acestea rămân principala cauză de mortalitate în lume, numărul deceselor provocate de acestea crescând pana la 33% în ultimii 30 de ani (https://heartreport23.world-heart-federation.org/).

Modificările structurale și funcționale care apar în îmbătrânire la nivelul inimii duc în final la insuficienta cardiacă (North and Sinclair, 2012). Principalele manifestări asociate cu îmbătrânirea cardiacă sunt reprezentate de fibroză (Biernacka and Frangogiannis, 2011), inflamație cronică (Ferrucci and Fabbri, 2018), hipertrofie (Olivetti et al., 2000) și angiogeneză afectată (Lähteenvuo and Rosenzweig, 2012). Când se examinează structura și funcția inimii, atenția se îndreaptă frecvent către cardiomiocite, chiar dacă fracția de celule non-miocitară reprezintă majoritatea celulelor din inimă. Acesta fracție include diverse tipuri celulare printre care fibroblaștii cardiaci, un grup eterogen și dinamic de celule care joacă un rol esențial, atât la nivel funcțional, cât și structural, în homeostazia cardiacă, atât în condiții normale, cât și patologice. Fibroblaștii cardiaci reprezintă aproximativ 15% din numărul total de celule în miocardul șoarecelui adult, fiind distribuiți printre cardiomiocite și posedă un program molecular specific ce le permite să integreze și să răspundă rapid la semnalele extracelulare după o leziune (Tallquist and Molkentin, 2017). Activarea căilor de semnalizare fibrotice datorită stimurilor de stres din îmbătrânire determina formarea fibrozei și hipertrofiei cardiace. Acestea sunt două semne importante ale îmbătrânirii cardiace fiind strâns interconectate și declanșate reciproc. În consecință, îmbătrânirea cardiacă este asociată cu disfuncție diastolică și insuficiență cardiacă cu funcție sistolică păstrată (HFpEF), având un efect negativ asupra populației în vârstă (Singam et al., 2020).

Infarctul miocardic (IM) reprezintă unul dintre cele mai devastatoare evenimente cardiovasculare iar îmbătrânirea crește riscul de IM si, mai mult, agravează și evoluția post-

infarct, întrucât inimile vârstnicilor prezintă o angiogeneză deficitară, o rezoluție ineficientă a inflamației și o capacitate regenerativă redusă (Olivetti et al., 1991, Dai et al., 2012). O caracteristică esențială a acestei remodelări maladaptive este fibroza cardiacă, definită prin depunerea excesivă de proteine ale matricei extracelulare (MEC), în special colagen. Deși fibroza stabilizează inițial miocardul lezat, acumularea excesivă de MEC compromite complianța ventriculară, perturbă funcția electrică și, în cele din urmă, duce la apariția insuficienței cardiace (Travers et al., 2016).

Fibroblaștii cardiaci sunt principalii contribuitori la fibroza post-IM, însă ei influențează și alte aspecte ale răspunsului de vindecare, precum inflamația (Theall and Alcaide, 2022) și maturarea cicatricei (Daseke et al., 2020). Dereglarea activării fibroblaștilor cardiaci în fazele precoce după leziune duce la vindecare deficitară și la agravarea performanței cardiace (Deb and Ubil, 2014). Totuși, aceeași cicatrice fibroasă care este inițial critică pentru supraviețuire, ulterior afectează contractilitatea și contribuie la disfuncția sistolică și la insuficiența cardiacă cronică (Smolgovsky et al., 2021).

La nivel molecular, tot mai multe dovezi subliniază importanța microRNA-urilor (miRNA) în îmbătrânirea și patologia cardiovasculară. Astfel, anumite miRNA-uri au fost implicate în patogeneza infarctului miocardic și a remodelării fibrotice având roluri pro- sau anti-fibrotice (Thum et al., 2008, van Rooij et al., 2008). Descoperirea legăturii dintre miARN-uri și anumite patologii a generat un interes semnificativ pentru explorarea potențialului acestora ca nouă clasă de medicamente, iar succesul global al vaccinurilor ARNm împotriva SARS-CoV-2 a sporit interesul pentru imunoterapiile bazate pe ARN. Astfel, terapiile pe bază de ARN au devenit opțiuni reale de tratament (Seyhan, 2024).

Pe baza acestor considerente **ipoteza** de la care am plecat susține că dereglarea profilului de expresie a miRNA-urilor în îmbătrânire afectează mecanismele moleculare de menținere a homeostaziei și determină atât deteriorarea funcțională sistemică, cât și declanșarea unor procese patologice, cum ar fi fibroza cardiacă și remodelarea maladaptativă după infarctul miocardic. Astfel, **scopul** tezei a fost sa exploreze rolul miARN-urilor ca regulatori cheie ai homeostaziei celulare și ca potențiale ținte terapeutice capabile să blocheze procesele patologice, precum remodelarea matricei extracelulare și fibroza cardiacă, contribuind astfel la identificarea unor strategii inovatoare pentru promovarea îmbătrânirii sănătoase și prevenirea complicațiilor asociate vârstei. Pentru a îndeplini acest scop, activitatea mea de cercetare în perioada doctoratului a urmărit următoarele **obiective specifice**:

1. Identificarea profilului de expresie a miRNA-urilor implicate în fiziopatologia sistemului

cardiovascular în populații individuale de celule cardiace izolate de la șoareci bătrâni;

2. Evaluarea *in vitro* a efectelor miARN-urilor asociate îmbătrânirii asupra fibroblaștilor cardiaci, prin analiza impactului lor asupra fenotipului pro-fibrotic și a căilor de semnalizare implicate în îmbătrânire (inflamație și remodelare tisulară);

3. Determinarea efectul terapeutic al modularii expresiei miRNA asupra remodelării maladaptative post-IM în îmbătrânire.

Structura tezei de doctorat

Teza de doctorat este formată din două parți principale:

Partea I-Studiul actual al cunoașterii este divizată în trei capitole. **Capitolul 1** intitulat *"Rolul îmbătrânirii în apariția bolilor cardiace,,* abordează aspecte despre trăsăturile generale ale îmbătrânirii, modificările cardiace asociate cu îmbătrânirea și se concentrează în final pe informații privind remodelarea cardiacă în miocardul bătrân cu boală cardiacă ischemică. **Capitolul 2** denumit *"Fibroblastul cardiac,,* evidențiază aspecte privind fibroblastul cardiac de la trăsăturile generale până la rolul acestui tip celular în homeostazia și fibroza cardiacă. În final, **capitolul 3** se axează pe descrierea rolului *"miRNA-urilor în îmbătrânirea cardiacă și în patologii asociate îmbătrânirii,,*. Acest capitol cuprinde o analiză a literaturii de specialitate privind nomenclatura și organizarea genomică a microARN-urilor, biogeneza acestora, mecanismele de acțiune și dereglarea microARN-urilor în îmbătrânirea cardiacă și bolile cardiace asociate. În final capitolul se sfârșește cu descrierea studiilor preclinice ce vizează utilizarea miARN în terapia fibrozei cardiace.

Partea II-Contribuții originale descrie rezultatele originale corespunzătoare studiilor desfășurate pentru atingerea obiectivelor tezei. Astfel, aceasta parte este împărțită în trei capitole a căror rezultate și concluzii sunt sintetizate mai jos:

Capitolul 1- MIARN IMPLICATE ÎN BOLILE CARDIOVASCULARE: ANALIZĂ ÎN ÎMBĂTRÂNIREA NATURALĂ, cuprinde studiul intitulat *"Creșterea lui miR-29a în îmbătrânire poate fii un mecanism compensator împotriva fibrozei cardiace prin scăderea proteinei Serpinh1,,*. În acest studiu ne-am concentrat pe identificarea rolurilor a patru miRNA (miR-18a, miR-21, miR-22 și miR-29a) cunoscute a fi implicate în boli cardiovasculare în procesul de îmbătrânire cardiacă. Folosind tehnici de biologie moleculară, biochimie și culturi celulare, descrise în secțiunile „*Protocoale experimentale și metode de analiză*" am arătat că fibroza cardiacă asociată îmbătrânirii este însoțită de o creștere a

expresiei miARN-urilor miR-29a, miR-18a, miR-21a și miR-22 în inimă, dintre care miR-29a se remarcă crescut și preponderent exprimat în multiple organe prelevate de la șoareci bătrâni sugerând o semnătură moleculară comună a procesului de îmbătrânire.

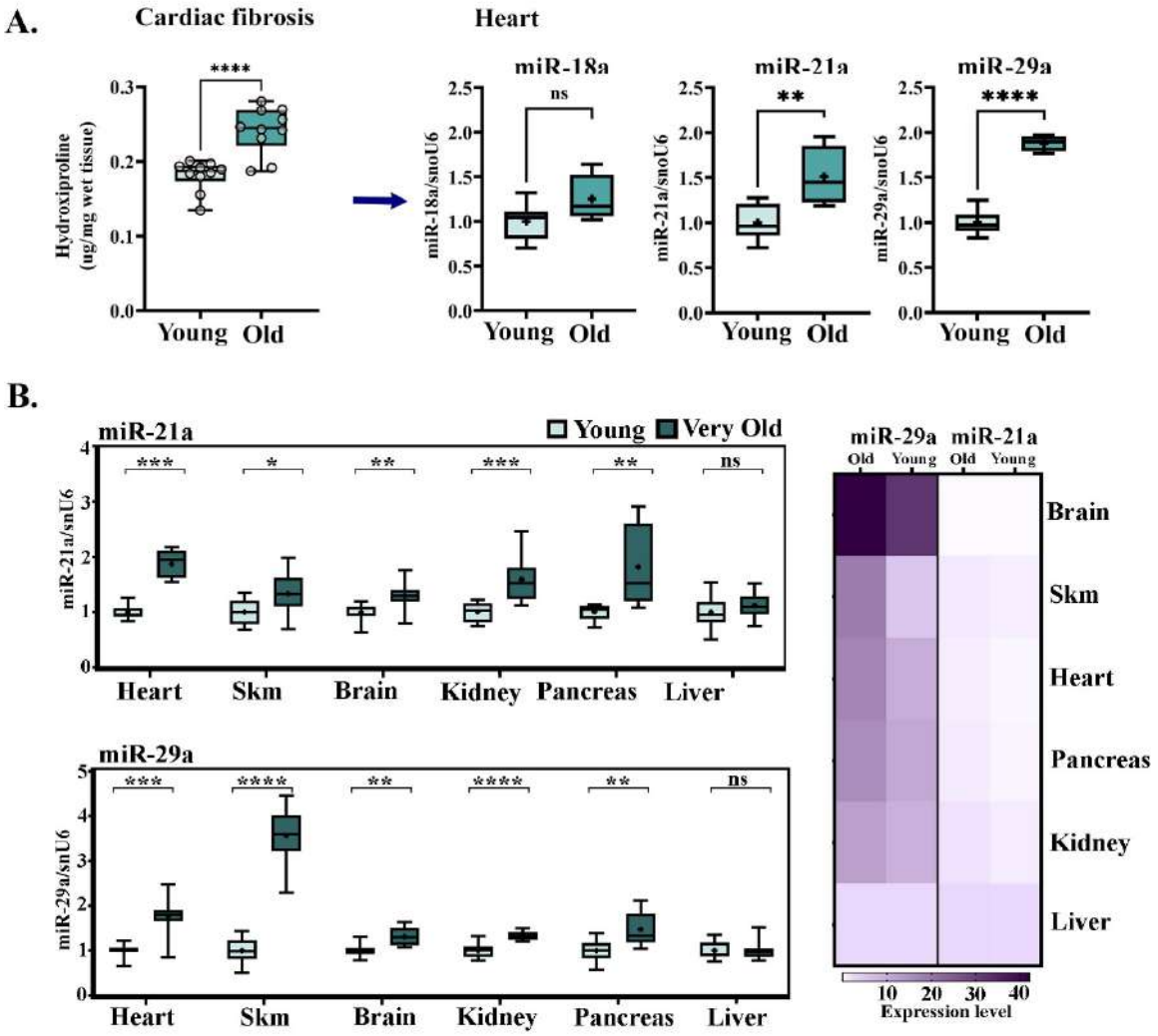


Figura 1. Investigarea profilului de expresie a miARN-urilor implicate în patologii cardiace în îmbătrânirea naturală. *(A.) Cuantificarea hidroxiprolinei și evaluarea miARN-urilor în inimi prelevate de la șoareci tineri și bătrâni; (B.) Evaluarea nivelului de expresie a lui miR-21a și miR-29a în multiple organe prelevate de la soareci tineri și batrani; Graficul de tip "heatmap" indică expresia 2^{-dCt} unde snU6 a fost utilizată ca genă de referință.*

Mai mult, prin analiza bioinformatică am identificat că miR-29a reglează în mod direct organizarea matricei extracelulare prin țintirea Serpinh1, o chaperonă esențială a colagenelor. Validările experimentale au confirmat Serpinh1 ca țintă directă a miR-29a,

expresia acestei gene fiind invers corelată cu nivelurile crescute de miR-29a în organele îmbătrânite.

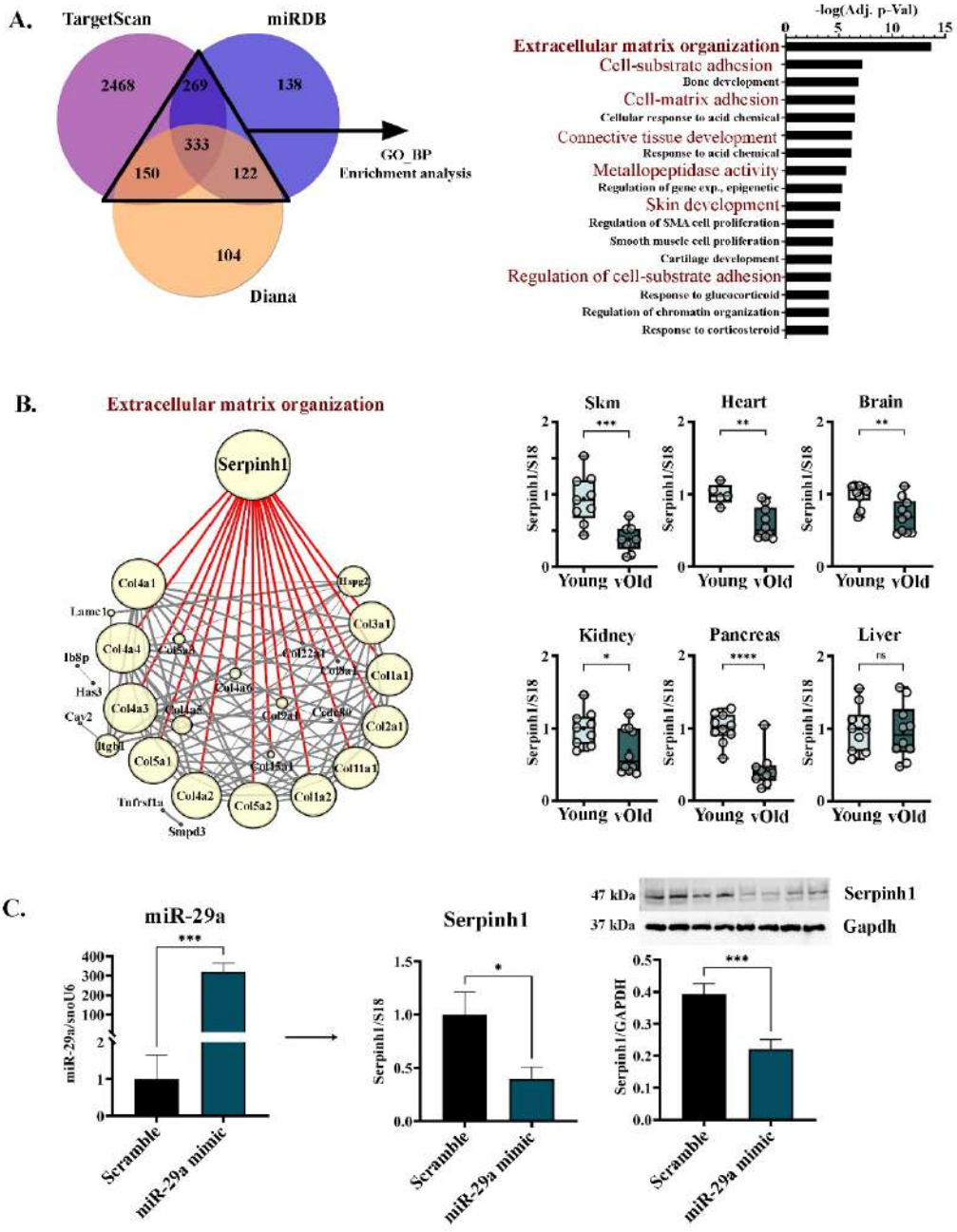


Figura 2. Identificarea Serpinh1 ca țintă al lui miR-29a. *(A.)Analiza bioinformatică de predicție a țintelor și proceselor biologice dereglate de miR-29a; (B.) Analiză PPI ce identifică Serpinh1 ca cea mai importanta proteină din ECM și validarea scăderii acesteia în multiple organe în îmbătrânire; (C.) Confirmarea in vitro a Serpinh1 ca țintă directă a lui miR-29a*

În final, studiile funcționale *in vitro* au evidențiat că supraexpresia miR-29a în fibroblaști și celule musculare cardiace inhibă proliferarea și migrarea celulară și reduce sinteza proteinelor pro-fibrotice, precum colagenul I și III, sugerând astfel că miR-29a funcționează ca un mecanism compensator anti-fibrotic, capabil să limiteze remodelarea patologică a matricei extracelular.

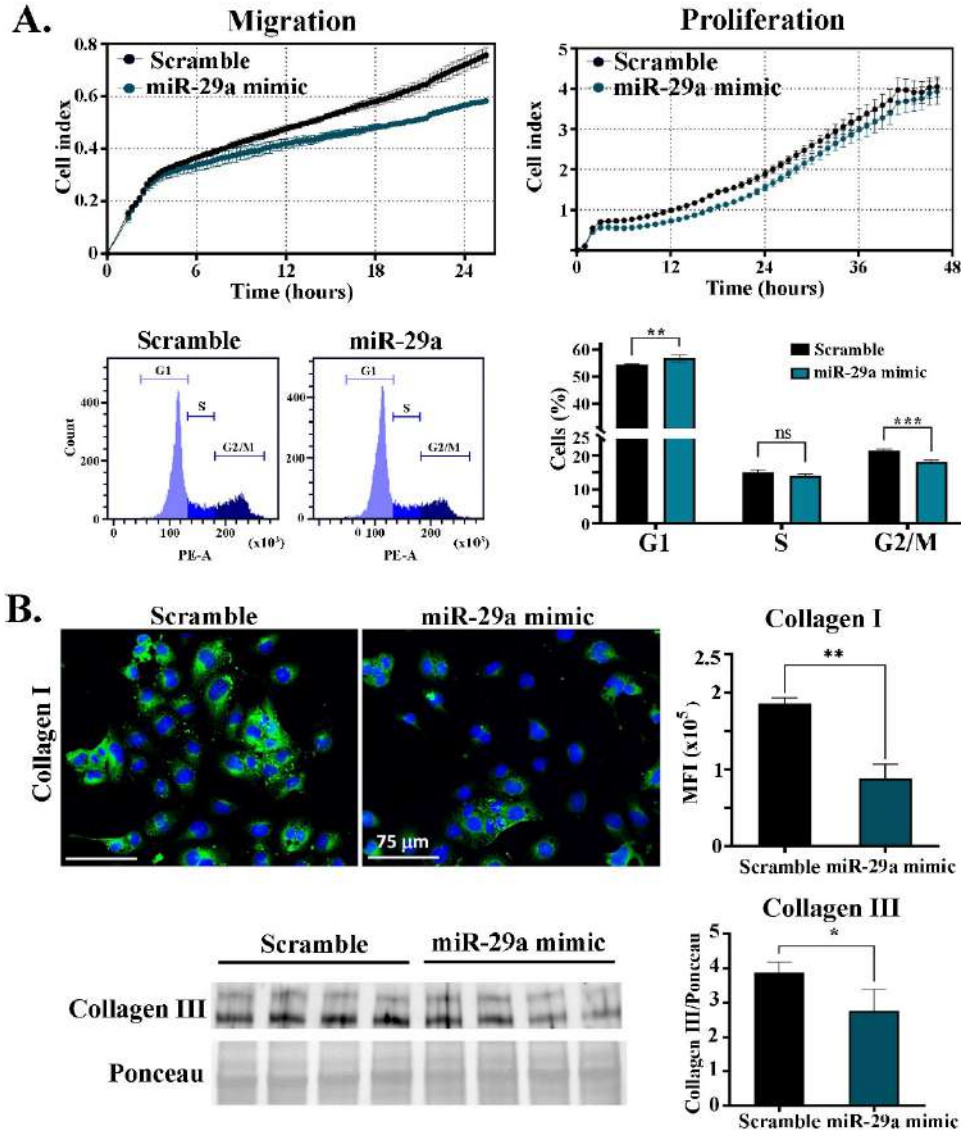


Figura 3. Rolul anti-fibrotic a lui miR-29a. *(A.) Efectul lui miR-29a asupra migrației și proliferării; (B.) Cuantificarea colagenului în celule ce supraexprimă miR-29a*

Capitolul 2- INVESTIGAREA UNOR MOLECULE DE MIARN CU EXPRESII SCĂZUTE ÎN FIBROBLAȘTII CARDIACI ÎN ÎMBĂTRÂNIREA NATURALĂ, cuprinde două studii:

Studiul 1- *"Izolarea şi caracterizarea fibroblaştilor şi cardiomiocitelor primare murine,,* a avut ca scop recuperarea unui număr maxim de celule cardiace, care să fie atât viabile, cât și funcționale. Astfel, cardiomiocitele murine adulte au fost izolate prin perfuzia retrogradă prin aorta, a tamponului de digestie ce a asigurat distribuția uniforma a enzimelor digestive prin rețeaua coronariană, ceea ce a facilitat o digestie eficientă și profundă a țesutului miocardic.

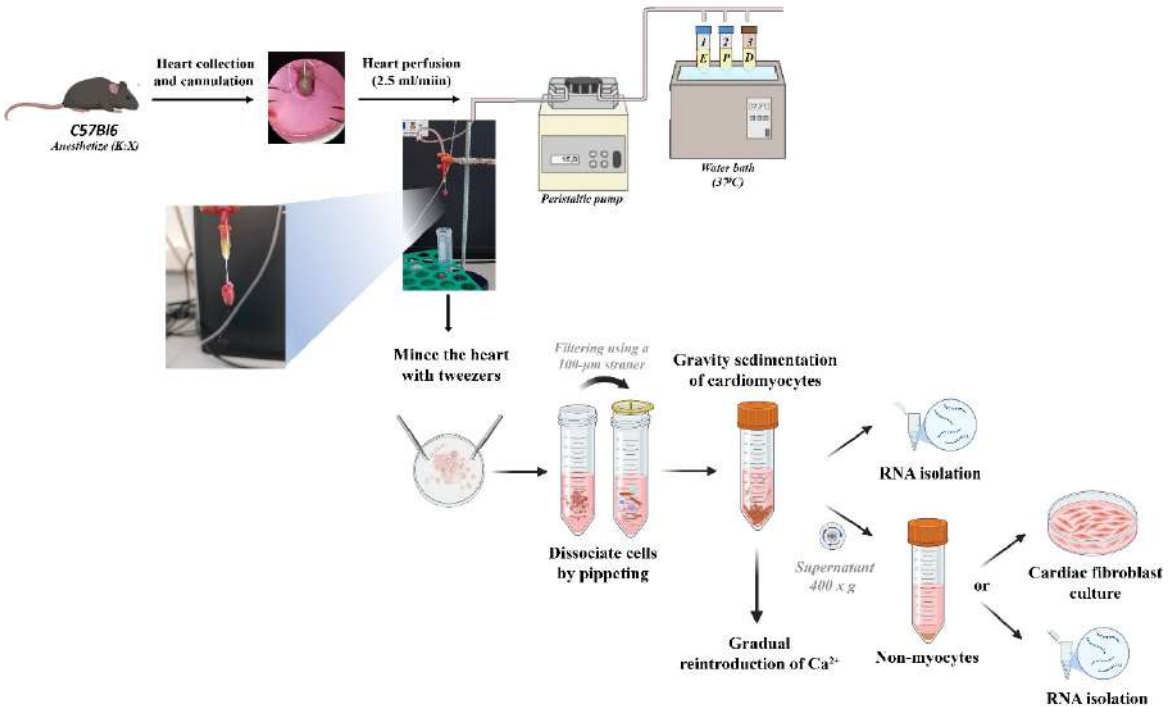


Figura 4. Etapele izolării cardiomiocitelor și celulelor non-miocitare. *Inima este fragmentată cu penseta, iar disocierea celulară este realizată prin pipetare, urmată de filtrare printr-o sită de 100 µm. Separarea cardiomiocitelor de celulele non-miocitare are loc prin sedimentare prin gravitație timp de 20 min; Supernatantul care conține celule non-miocitare este centrifugat (400 × g) pentru a obține un pelet celular, utilizat fie pentru cultura fibroblastelor cardiace, fie pentru izolarea ARN; Dacă miocitele nu sunt cultivate acestea sunt preluate pentru izolarea de RNA; În caz de cultură, cardiomiocitele sunt supuse reintroducerii graduale a calciului (0,34 mM → 0,68 mM → 1,02 mM Ca^{2+}), urmată de însămânțare timp de 1 oră pe suprafețe acoperite cu laminină și apoi menținute în cultură.*

În ceea ce privește fibroblaștii cardiaci, au fost standardizate trei protocoale, bazate pe digestii enzimatice cu enzime diferite. Comparația celor trei protocoale de izolare a dus la concluzia că protocolul bazat pe digestie fracționată a oferit cel mai bun echilibru între randament, viabilitate și puritate, permițând obținerea unor culturi stabile și reproductibile.

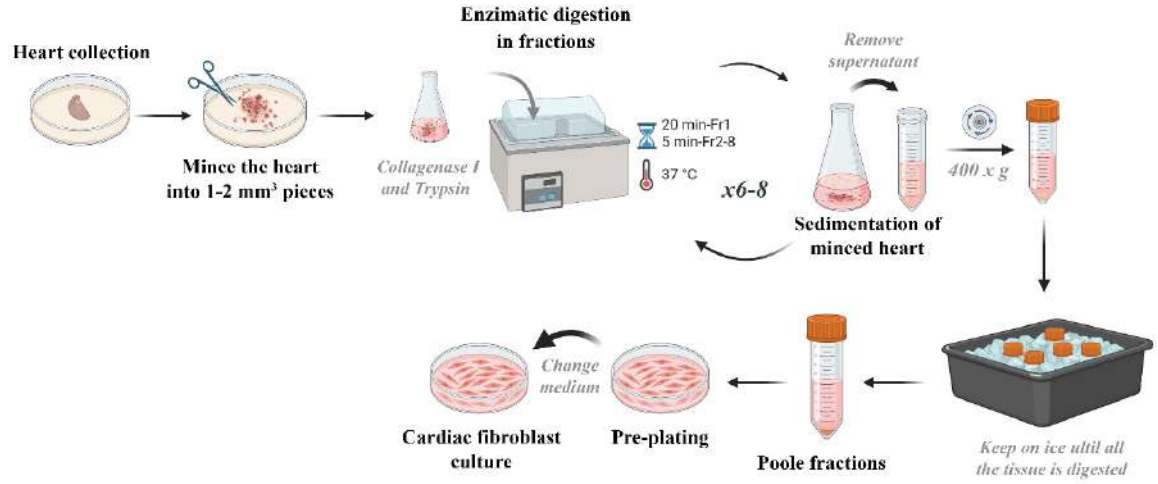


Figura 5. Etapele izolării fibroblaștilor cardiaci utilizând digestia în fracții*. După recoltare, inima este mărunțită în bucăți de 1–2 mm³, urmate de digestie enzimatică în fracții cu colagenază I și tripsină la 37°C. După fiecare rundă de digestie (20 min pentru prima fracție, 5 min pentru următoarele), supernatantul este separat, iar celulele sunt colectate prin centrifugare la 400 × g. Fracțiile obținute sunt păstrate pe gheață până la finalizarea digestiei. La final fracțiile sunt combinate iar celulele sunt însămânțate pentru pre-plating timp de 24h.*

Caracterizarea culturilor primare pure a fost realizată cu succes prin marcarea imunofluorescentă a markerilor specifici (Pdgfra, S100A4, alpha-SMA, Collagen I și Collagen III). Analiza comparativă a fibroblaștilor cardiacii izolați de la șoareci tineri și bătrâni a relevat că schimbările fenotipice asociate îmbătrânirii naturale au fost moderate, dar semnificative, la nivel celular. Astfel, fibroblaștii din animale bătrâne prezintă o ușoară creștere a dimensiunii celulare, o reorganizare a αSMA și o dependență mai mare de metabolismul glicolitic, asociată cu o capacitate redusă de adaptare la stres metabolic.

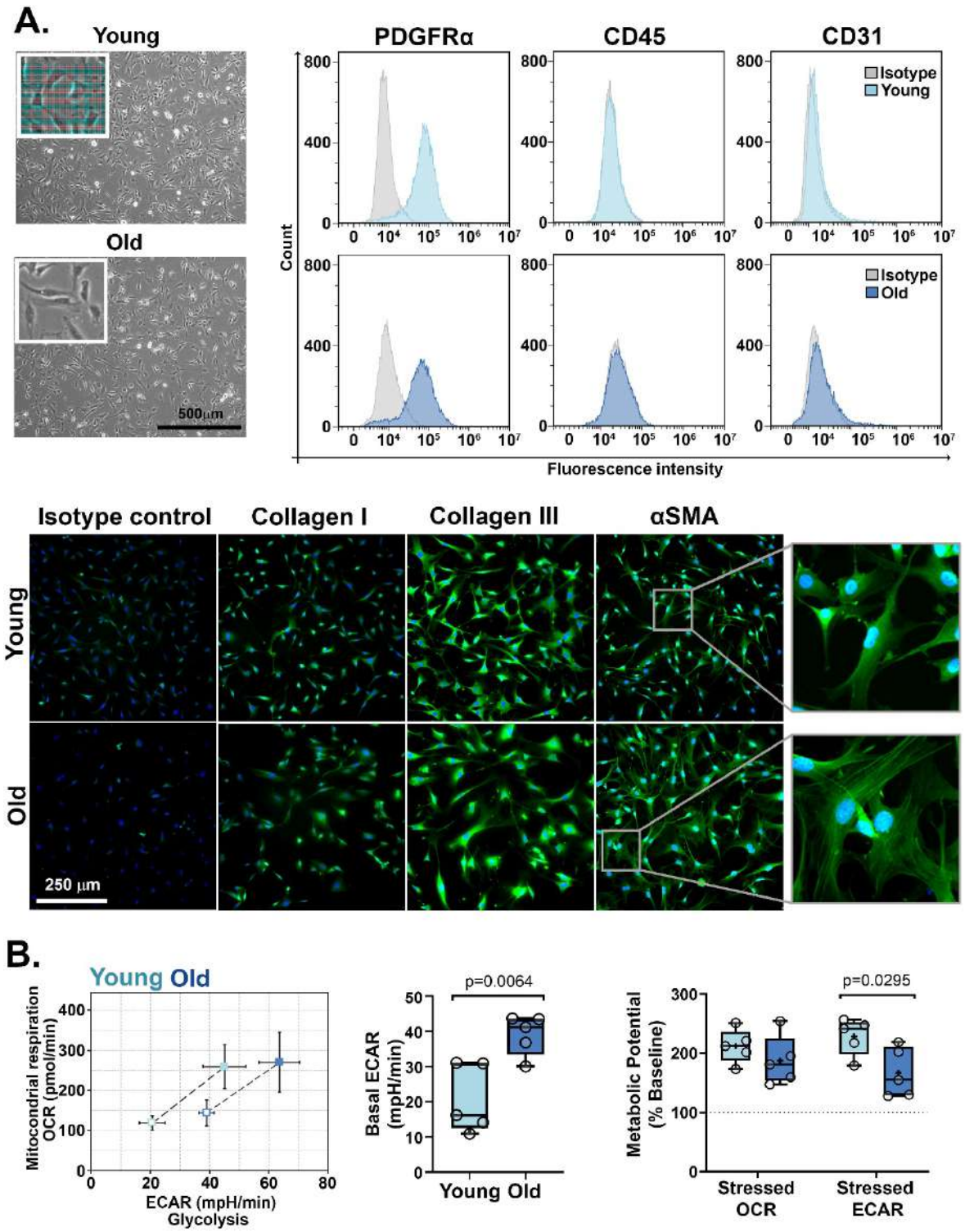


Figura 6. Diferențe ale fibroblaștilor cardiaci derivați de la șoareci tineri și bătrâni. *(A.) Caracterizarea morfologică și imunofenotipică a fibroblaștilor prin citometrie în flux și microscopie de fluorescentă a celulelor derivate de la șoareci tineri și bătrâni după 5 zile de cultură; (B.) Diferențe metabolice între fibroblasti tineri și bărăni*

(C) Imagini de microscopie fluorescentă ilustrând prezența αSMA, colagenului I și colagenului III. Se observă modele diferite de distribuție a SMA în cele două grupuri (caseta). Imaginile sunt reprezentative pentru trei experimente.

Studiul 2-*"MiARN-urile generate de locusul Meg3-Mirg sunt scăzute în timpul îmbătrânirii naturale"*. În acest studiu, am arătat că la nivelul fibroblaștilor cardiaci, îmbătrânirea naturală a fost corelată cu o modificare moderată a expresiei a 88 de miARN-uri. Dintre acestea, 68% au avut scăderi semnificative, iar aproximativ jumătate dintre acestea au avut originea în locusul Meg3-Mirg de pe cromozomul 12.

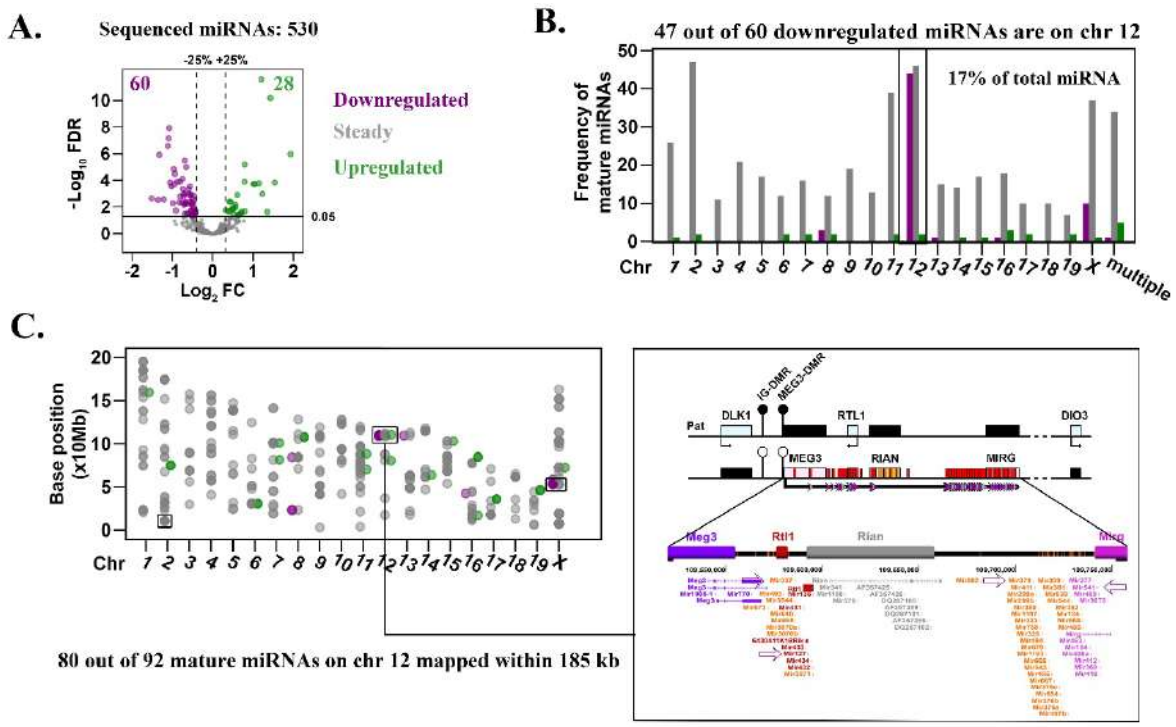


Figura 7. Identificarea miRNA-urilor în fibroblaștii cardiaci izolați de la șoareci tineri și bătrâni. *(A.) Grafic de tip volcano plot ce arată analiza miARN-urilor diferențial exprimate; (B.) Frecvența miRNA-urilor mature mapate pe fiecare cromozom al șoarecelui; (C.) Localizarea genomică a miRNA-urilor mature, reprezentată prin poziția la care începe gena corespunzătoare (miRNA-urile mature cu localizări genomice multiple nu au fost ilustrate) și reprezentarea schematică a locusului Meg3-Mirg ca parte a locusului cu imprinting patern Dlk1-Dio3. Locusul Meg3-Mirg este exprimat de pe alela maternă și conține exclusiv ARN-uri non-codante, adică lncRNA (Meg3, Rian, Mirg), snoRNA (bare portocalii) și miRNA (bare roșii). MiRNA-urile alese ca reprezentative pentru clusterul Meg3-Mirg sunt evidențiate prin săgeți.*

Astfel, îmbătrânirea naturală este asociată cu reprimarea coordonată a patru miRNA-uri reprezentative (miR-337-5p, miR-127-3p, miR-379-5p, miR-541-5p) din mega-clusterul Meg3-Mirg, fenomen observat atât în fibroblaștii cardiaci, cât și în alte organe precum mușchi scheletic, ficat și ventricule cardiace.

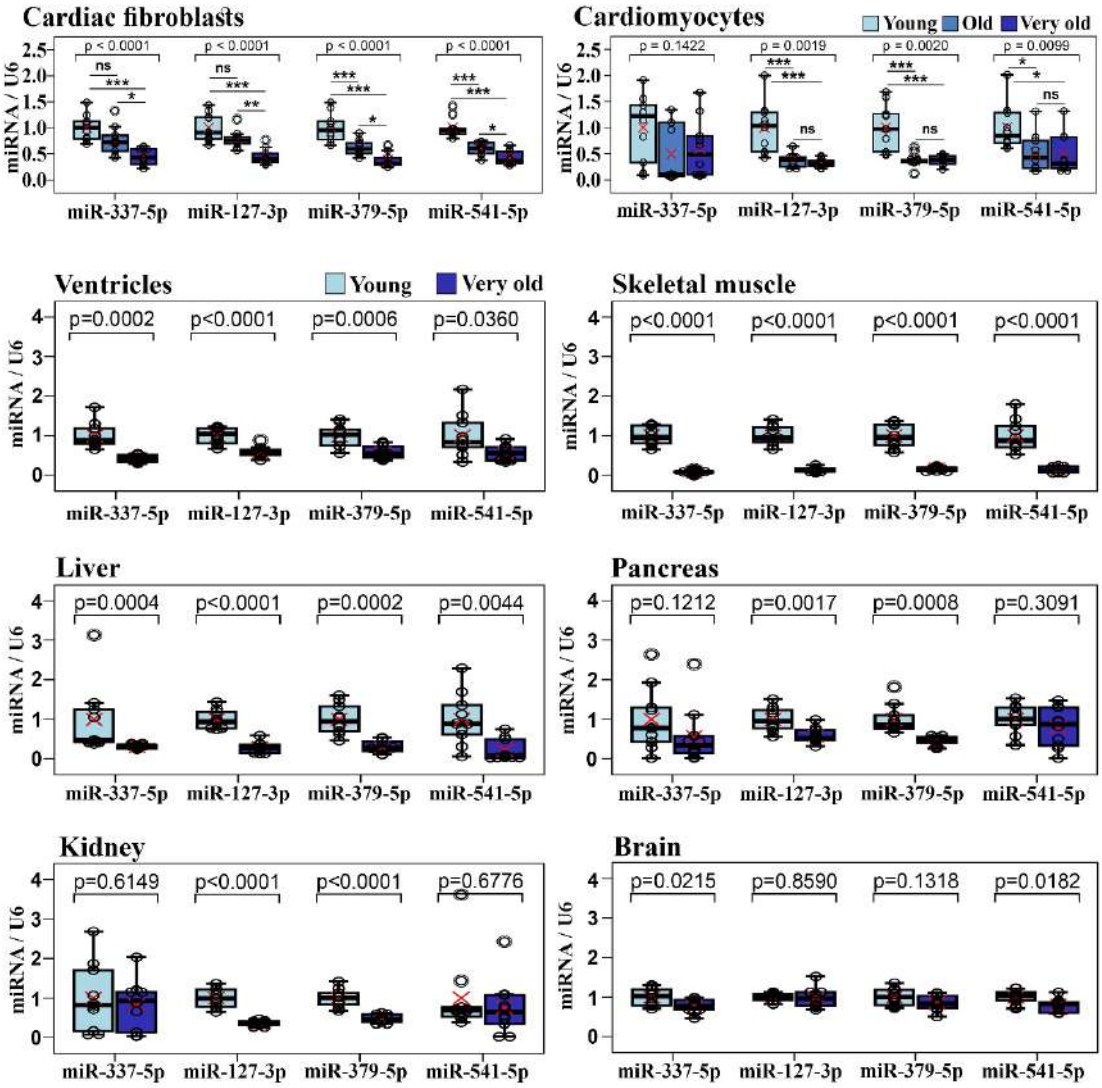


Figura 8. Analiza de RT-qPCR a celor 4 miRNA-uri reprezentative pentru locusul Meg3-Mirg în celule cardiace și multiple organe prelevate de la șoareci tineri și bătrâni.

Mai mult, țintele tuturor miARN-uri din cluster au fost semnificativ îmbogățite în căi KEGG implicate în longevitate, inflamație și fibroză, ceea ce sugerează un rol central al locusului în reglarea proceselor asociate vârstei. Acesta analiza a condus în final la identificarea Itgb2 ca genă-țintă relevantă a miARN-urilor din Meg3-Mirg, fiind supraexprimată în mai multe organe îmbătrânite (inimă, creier, rinichi, pancreas, fibroblaste cardiace).

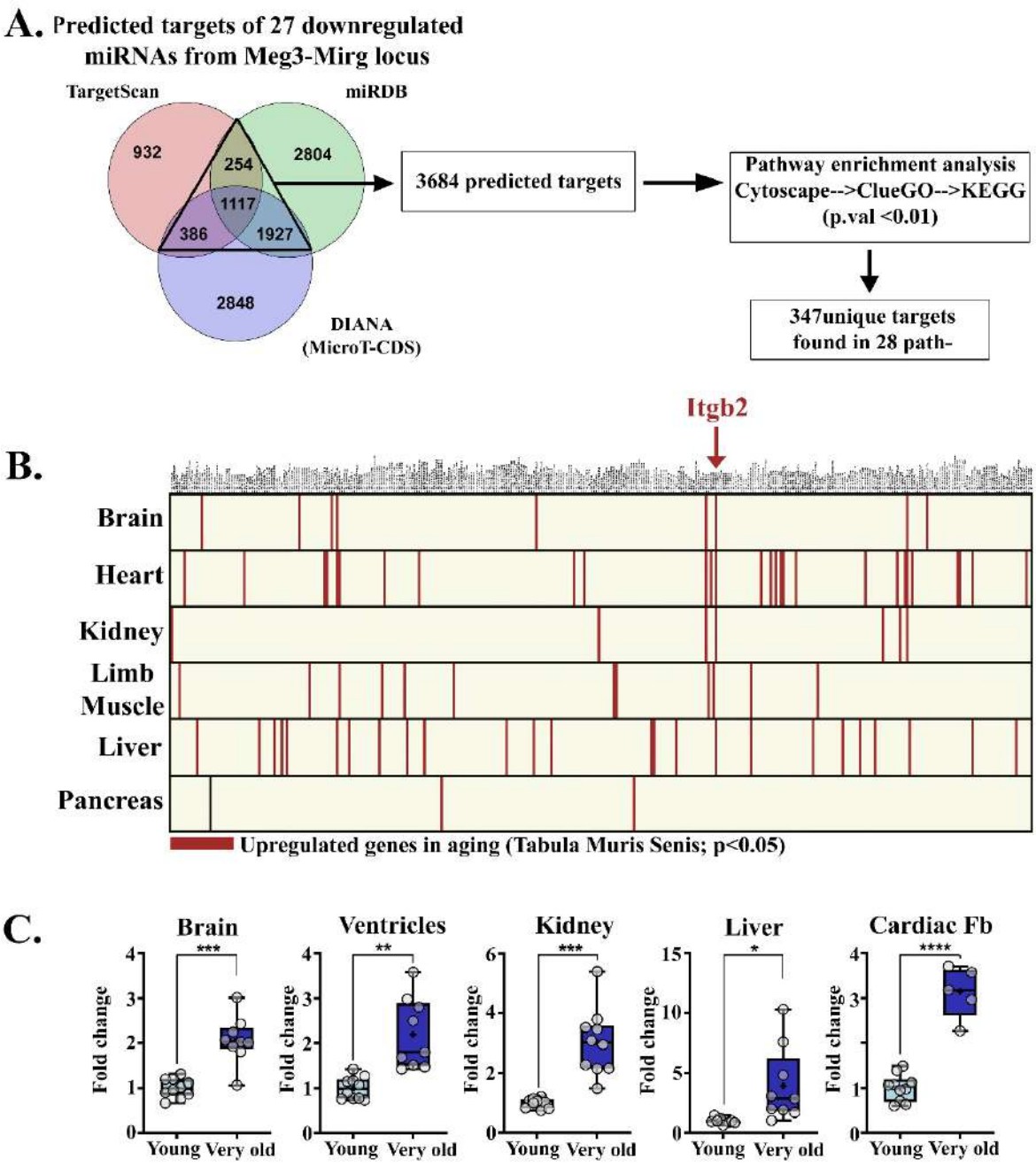


Figura 9. Gene supraexprimate în îmbătrânire care sunt țintite de miRNA-uri din locusul Meg3-Mirg. *(A.) Diagramă Venn care ilustrează țintele prezise ale celor 27 de miRNA-uri cu reglare descendentă; (B.) Ilustrație grafică a intersecției dintre genele unice găsite în calea KEGG și genele supraexprimate identificate în baza de date Tabula Muris Senis. Genele supraexprimate sunt evidențiate pentru fiecare organ.* Itgb2 *a reieșit drept singura genă supraexprimată în 4 din 6 organe; (C.) Expresia genei* Itgb2 *în creier, ventricul, rinichi, ficat și în fibroblaste cardiace cultivate*

Capitolul 3 - INVESTIGAREA UNOR MOLECULE DE MIARN CU EXPRESII CRESCUTE ÎN FIBROBLAȘTII CARDIACI ÎN ÎMBĂTRÂNIREA NATURALĂ, cuprinde studiul intitulat *"Activarea miR-10b în fibroblaștii cardiaci atenuează remodelarea adversă după infarctul miocardic în timpul îmbătrânirii prin țintirea Lpar2„*. În acest studiu ne-am axat pe identificarea rolurilor miARN-urilor crescute în fibroblaștii cardiaci în procesul de remodelare post-IM în timpul îmbătrânirii. Folosind studii funcționale *in vivo*, tehnici de biologie moleculară, biochimie, clonare și culturi celulare, descrise în secțiunile „*Protocoale experimentale și metode de analiză*", am arătat că miR-10b-5p a fost validat ca fiind supraexprimat specific în cFb izolați din șoareci masculi pe parcursul îmbătrânirii. Această creștere a fost confirmată și la nivelul inimii îmbătrânite, fiind atribuită exclusiv acumulării miR-10b în cFb și nu în cardiomiocite (CM), sugerând un rol important al acestui miARN în procesele de remodelare fibrotică asociate îmbătrânirii.

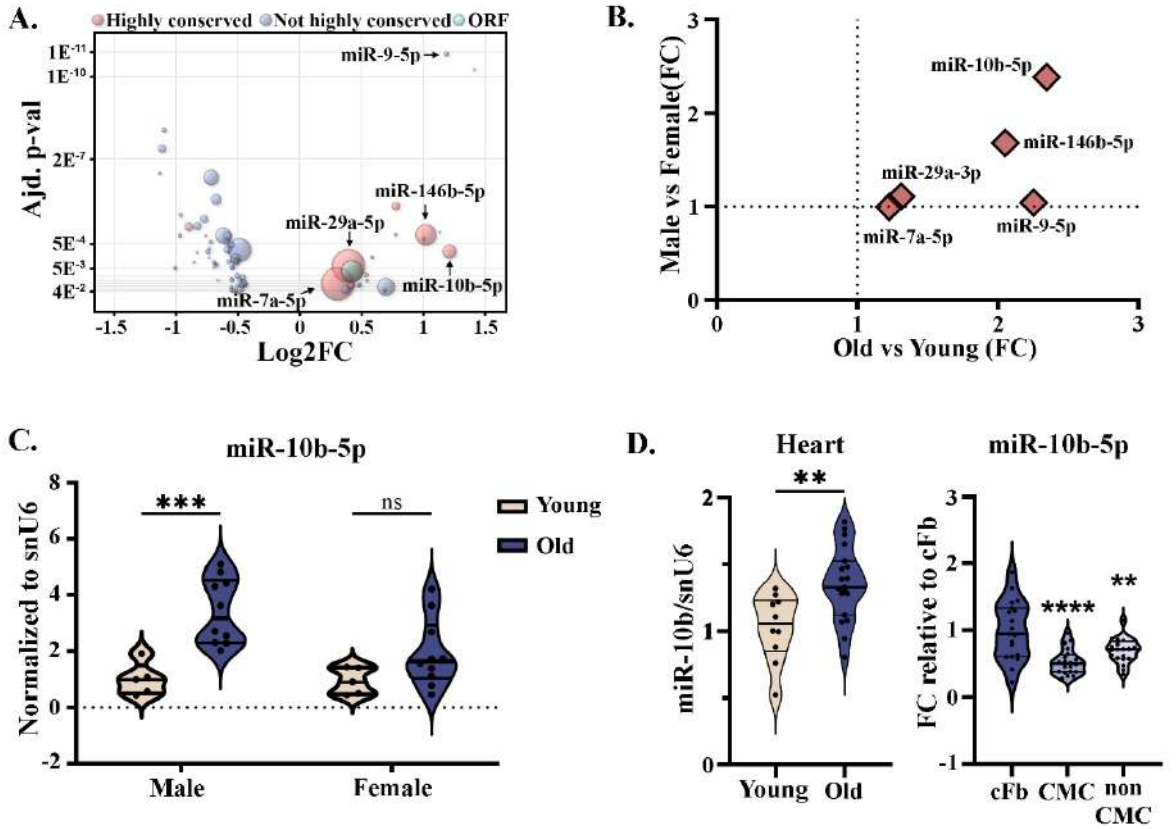


Figura 10. Dereglarea nivelului de expresie a lui miR-10b în îmbătrânirea cardiacă. *(A.) Vulcano bubble plot ce arată totalitatea miARN-urilor dereglate în fibroblaștii cardiaci în timpul îmbătrânirii. Dimensiunea bulelor reprezintă media nivelului de expresie (RPM-citiri pe milion) și culoarea reprezintă statusul de conservare: rosu= înalt conservate (conservate la vertebrate); albastru=conservate doar la mamifere; (B.) Analiza dependenței de sex a genelor supraexprimate în timpul îmbătrânirii; (C.) Validarea expresiei genice prin RT-*

qPCR a miR-10b în fibroblaștii cardiaci izolați de la animale tinere și bătrâne;(D.) Expresia relativă a miR-10b în inimi și celule cardiace izolate la șoareci tineri și bătrâni.

Datele noastre au evidențiat faptul că miR-10b a prezentat o reglare bifazică în timpul infarctului miocardic, fiind redus în faza inflamatorie și crescut în fazele de reparare/maturare ale IM. În faza acută, semnalele inflamatorii precum TNF-α inhibă expresia sa, facilitând activarea fibroblaștilor și depunerea matricei în timp ce creșterea nivelului de miR-10b promovează apoptoza fibroblaștilor și stabilizează cicatricea, prevenind acumularea excesivă de ECM.

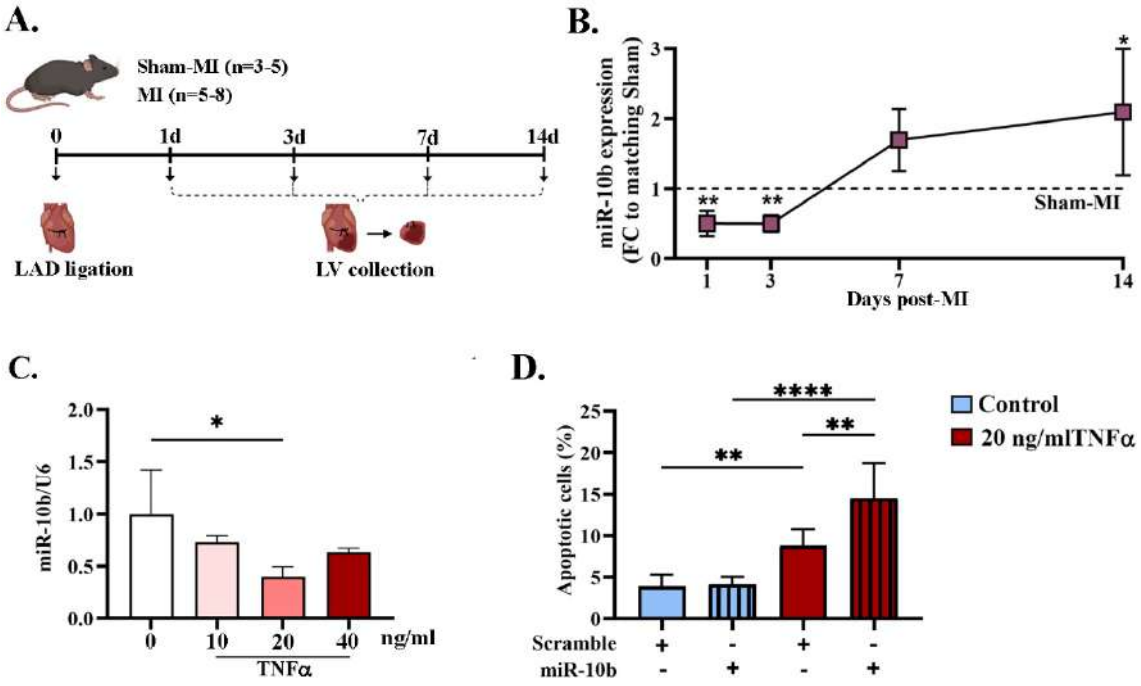


Figura 11. Expresia si rolul lui miR-10b în fazele reparatorii post-MI. *(A.) Reprezentarea schematică a designului experimental. Infarctul miocardic a fost indus la șoarecii C57Bl5 tineri (2-3 luni) prin ligatura arterei coronare descendente anterioare (LAD). Regiunea infarctată a ventriculului stâng a fost recoltată în azot lichid la 1, 3, 7 și 14 zile post-IM; (B.) Evoluția expresiei lui miR-10b la diferite intervale de timp post-MI; (C.) Expresia miR-10b în fibroblaste cardiace expuse 24h la diferite concentrații de TNFα; (D.) Impactul lui miR-10b asupra apoptozei celulare în condiții inflamatorii.*

Analiza bioinformatică și testele funcționale au identificat Lpar2 ca țintă directă a miR-10b. Supraexpresia miR-10b în fibroblaștii cardiaci bătrâni a redus nivelul Lpar2 la nivel transcripțional și proteic, iar testele cu luciferază au confirmat interacțiunea directă miR-10b-Lpar2.

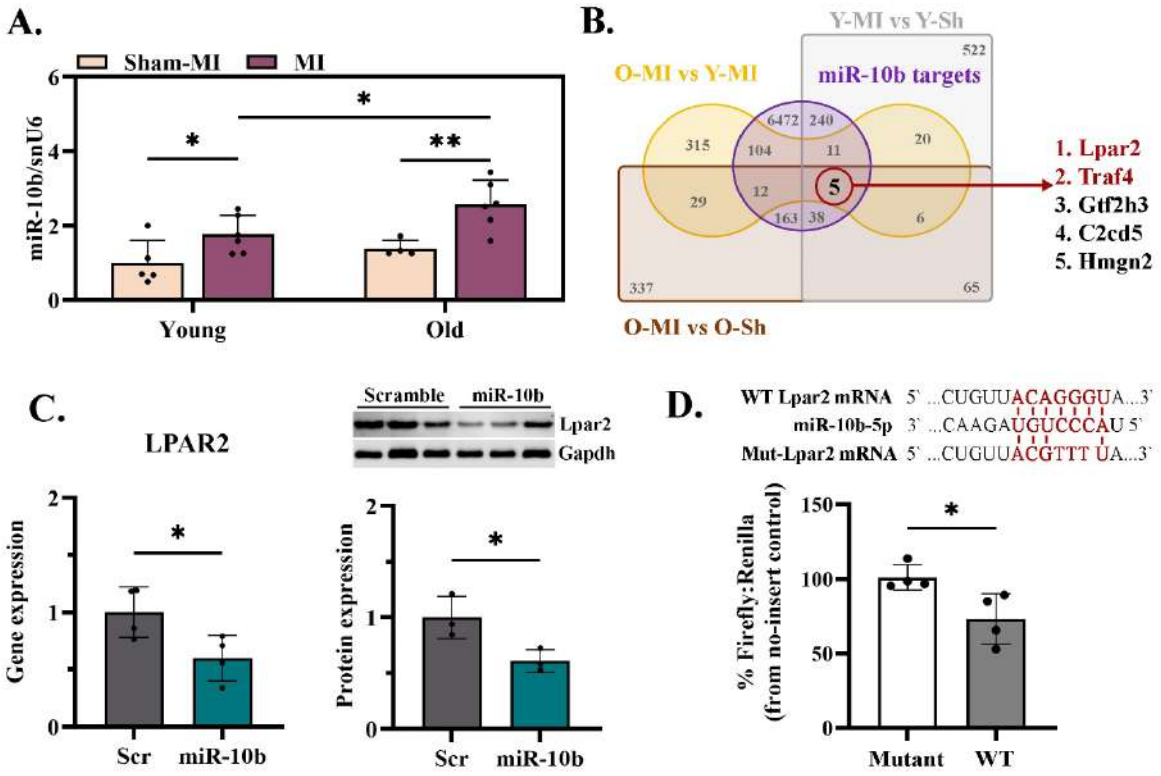


Figura 12. Identificarea și validarea Lpar2 ca țintă al lui miR-10b. *(A.) Analiza RT-qPCR a nivelului genic a lui miR-10b în fibroblaștii cardiaci izolați de la șoareci tineri și bătrâni la 7 zile post-IM; (B.) Analiza bioinformatică de identificare a genelor țintă pentru miR-10b. Genele comune identificate ca fiind scăzute în grupurile experimentale Y-MI vs Y-Sham, O-MI vs O-Sham și O-MI vs Y-MI au fost suprapuse cu țintele prezise ale miR-10b găsite în 4 baze de date; (C.) Expresia genică și proteică a lui Lpar2 în fibroblaștii cardiaci izolați din șoareci bătrâni și testul Dual-luciferase reporter care demonstrează interacțiunea directă dintre Lpar2 și miR-10b-5p.*

În plus, testele funcționale au arătat că, în prezența unui agonist specific pentru Lpar2, supraexpresia miR-10b reduce proliferarea și expresia genelor pentru colagen I/III în cFb bătrâni, consolidând rolul acestei căi de semnalizare în procesul de fibroză.

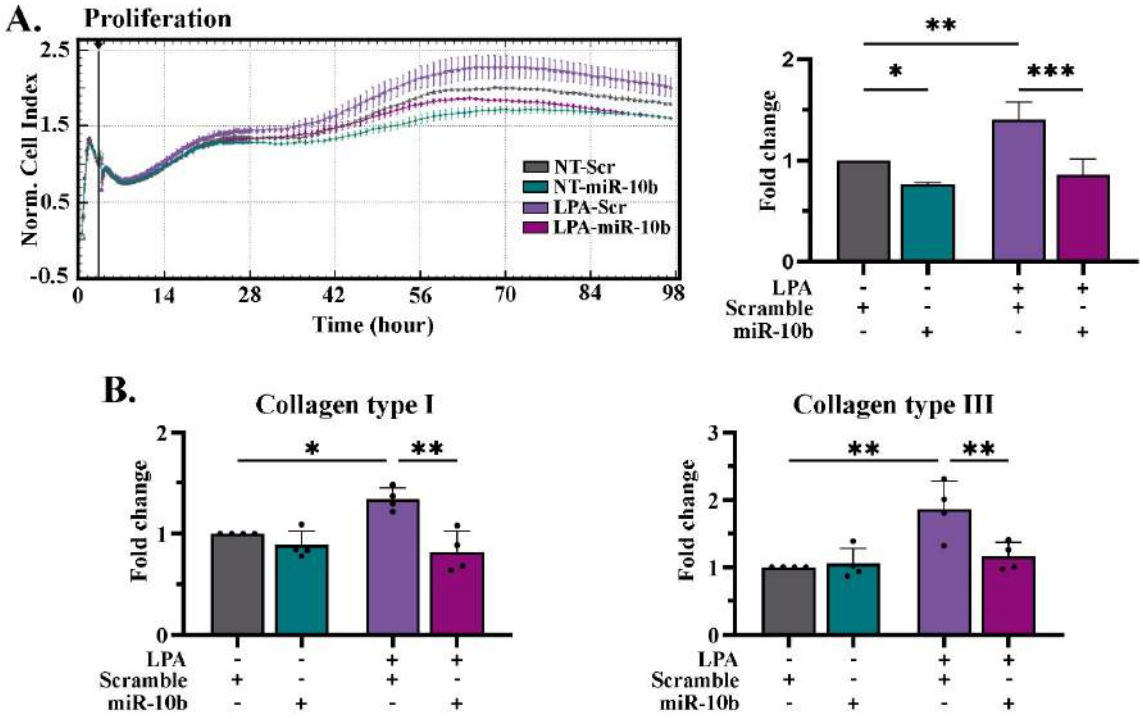


Figura 13. Rolul axei miR-10b/Lpar2 în procesul fibrotic. *(A.) Celulele au fost transfectate cu miR-10b sau Scramble timp de 24 de ore și expuse timp de 98 de ore la agonistul LPA2. Plotul din stânga ilustrează indexul celular normalizat, reprezentând media ± DS a două sau trei godeuri individuale dintr-un experiment reprezentativ. Graficul din dreapta cuantifică panta curbelor de proliferare din trei experimente separate, ce descrie gradientul și rata de modificare a curbelor indexului celular în intervalul de 98h de tratament. Rezultatele sunt raportate la controlul Scramble pentru fiecare experiment în parte; (B.) Cuantificarea relativă prin RT-qPCR a genelor Colagen I și III în fibroblasti cardiaci bătrâni imortalizați ce supraexprimă miR-10b după 48 de ore de tratament cu agoLPA2.*

În final, am demonstrat că inhibiția *in vivo* a miR-10b prin antagomir a exacerbat remodelarea adversă post-IM la șoarecii bătrâni, determinând agravarea dilatării ventriculare, a subțierii peretelui și a disfuncției cardiace. Aceste date definesc axa miR-10b–Lpar2 ca un mecanism critic de control al proliferării fibroblaștilor și al depunerii matricei extracelulare în contextul îmbătrânirii, cu potențial de a fi exploatată terapeutic.

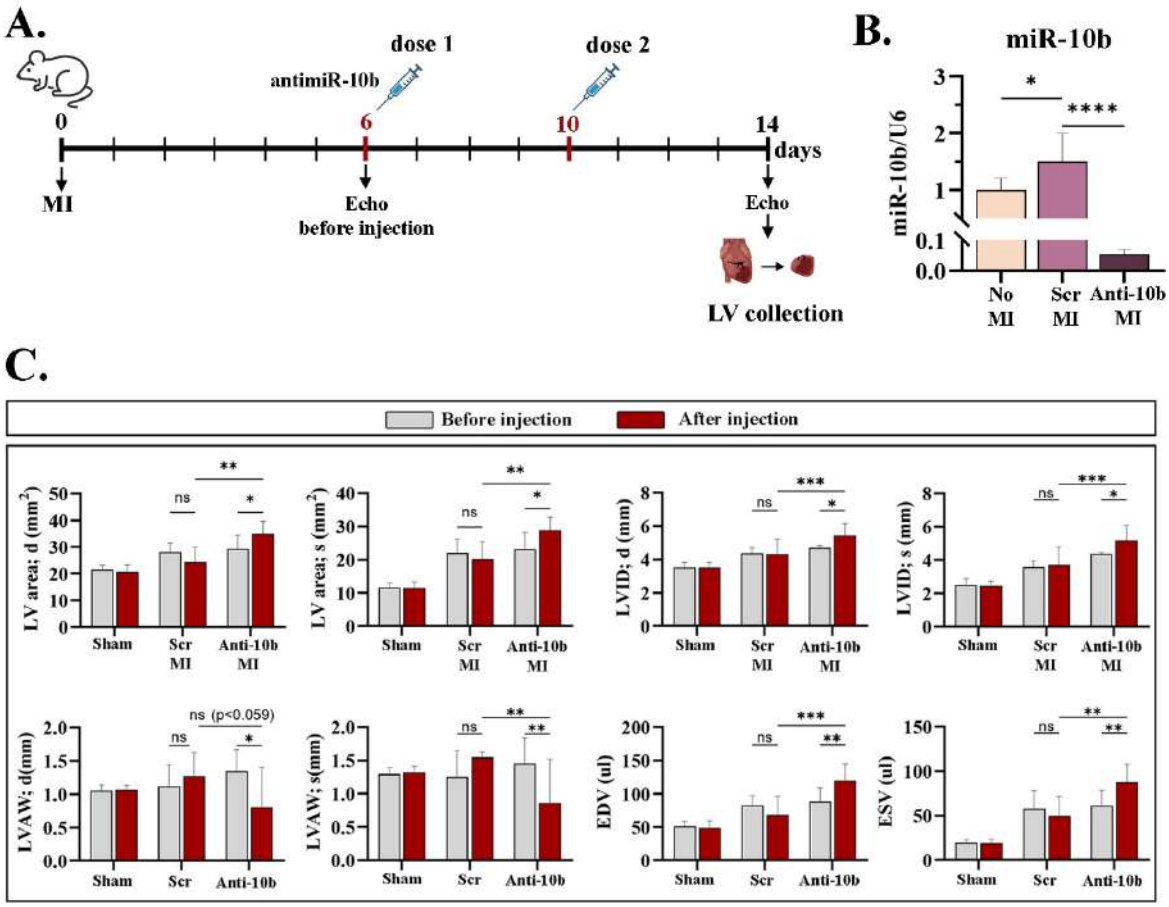


Figura 14. Studiul de inhibiție in vivo a lui miR-10b după IM. *(A.) Cronogramă ce ilustrează designul experimental. Șoareci C57Bl6 batrani (de 17-18 luni) au fost supuși intervenției chirurgicale Sham sau IM. O concentrație de 10 mg/kg Scramble (Scr) sau AntagomiR-10b (Anti-10b) a fost administrat grupului IM în ziua 6 și ziua 10 post-procedură; (B.) Nivelul de expresie a genei miR-10b în ventriculul stâng după infarctul miocardic; (C.) Cuantificarea înregistrărilor ecocardiografice într-un ciclu cardiac a ariei VS, diametrului intern al VS (LVID), peretelui anterior al VS (LVAW) și volumelor telesistolice (ESV) și telediastolice (EDV) la șoareci aflați în cohorta de studiu. Măsurătorile au fost efectuate înainte de prima doză de tratament și la sfârșitul timpului experimental (după injecție).*

Contribuțiile originale ale tezei

- Standardizarea protocoalelor pentru obținerea de fibroblaști cardiaci și cardiomiocite murine adulte pentru studii *in vitro*;
- Demonstrarea unui fenotip de fragilitate la fibroblaștii cardiaci din inimi bătrâne, caracterizat prin reorganizarea fibrelor de stres și schimbări metabolice cu preferință pentru glicoliză și pierderea flexibilității energetice în condiții de stres.
- Identificarea și caracterizarea profilul de expresie a miARN-urilor în fibroblaștii cardiaci izolați de la șoareci bătrâni și tineri.
- Identificarea miR-29a ca având un nivel crescut în mod global odată cu îmbătrânirea, modificarea sa exercitând un rol compensator, cu efecte anti-fibrotice în acest proces.
- Demonstrarea că miR-10b este crescut în inima îmbătrânită a indivizilor masculi, datorită supraexpresiei sale în fibroblaștii cardiaci și nu în cardiomiocite.
- Identificarea lui miR-10b ca fiind reglat temporal, expresia lui fiind scăzută în faza inflamatorie post-IM și crescută ulterior, în fazele de reparare și maturare a cicatricei.
- Demonstrarea că expunerea cFb la stimuli inflamatori, precum TNF-aplha, reduce expresia miR-10b, iar supraexpresia acestuia în aceleași condiții favorizează apoptoza celulară.
- Demonstrarea rolului anti-fibrotic al miR-10b în condiții normale, în cFb, cu impcat asupra scăderea proliferării, migrației și a *Ctgf*
- Identificarea si validarea Lpar2 ca țintă directă a miR-10b, atât la nivel de expresie genică, cât și proteică.
- Demonstrarea că activarea receptorului Lpar2, indusă prin expunerea la agonistul LPA2, este inhibată de supraexpresia miR-10b în cFb, ceea ce conduce la reducerea proliferării celulare și la diminuarea expresiei genelor pro-fibrotice, precum colagenul I și colagenul II. Aceste rezultate validând rolul anti-fibrotic al lui miR-10b.
- Demonstrarea ca inhibiția *in vivo* a lui miR-10b după IM duce la exacerbarea remodelării fibrotice după IM în îmbătrânire.

Bibliografie

(1) Biernacka, A. & Frangogiannis, N. G. 2011. *Aging and cardiac fibrosis*. Aging Dis, 2, 158–173.

(2) Dai, D. F., Chen, T., Johnson, S. C., Szeto, H. & Rabinovitch, P. S. 2012. *Cardiac aging: from molecular mechanisms to significance in human health and disease*. Antioxid Redox Signal, 16, 1492–526.

(3) Daseke, M. J., 2nd, Tenkorang, M. A. A., Chalise, U., Konfrst, S. R. & Lindsey, M. L. 2020. *Cardiac fibroblast activation during myocardial infarction wound healing: fibroblast polarization after mi*. Matrix Biol, 91-92, 109–116.

(4) Deb, A. & Ubil, E. 2014. *Cardiac fibroblast in development and wound healing*. J Mol Cell Cardiol, 70, 47–55.

(5) Ferrucci, L. & Fabbri, E. 2018. *Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty.* Nat Rev Cardiol, 15, 505–522.

(6) Gupta, S. K., Piccoli, M. T. & Thum, T. 2014. *Non-coding rnas in cardiovascular ageing.* Ageing Res Rev, 17, 79–85.

(7) https://heartreport23.world-heart-federation.org/, accesat august 2024

(8) Lähteenvuo, J. & Rosenzweig, A. 2012. *Effects of aging on angiogenesis*. Circ Res, 110, 1252–64.

(9) North, B. J. & Sinclair, D. A. 2012. *The Intersection Between Aging And Cardiovascular Disease*. Circ Res, 110, 1097–108.

(10) Olivetti, G., Cigola, E., Maestri, R., Lagrasta, C., Corradi, D. & Quaini, F. 2000. *Recent advances in cardiac hypertrophy*. Cardiovasc Res, 45, 68–75.

(11) Olivetti, G., Melissari, M., Capasso, J. M. & Anversa, P. 1991. *Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy*. Circ Res, 68, 1560–8.

(12) Seyhan, A. A. 2024. *Trials and tribulations of microrna therapeutics*. Int J Mol Sci, 25.

(13) Singam, N. S. V., Fine, C. & Fleg, J. L. 2020. *Cardiac changes associated with vascular aging*. Clin Cardiol, 43, 92–98.

(14) Smolgovsky, S., Ibeh, U., Tamayo, T. P. & Alcaide, P. 2021. *Adding insult to injury - inflammation at the heart of cardiac fibrosis*. Cell Signal, 77, 109828.

(15) Tallquist, M. D. & Molkentin, J. D. 2017. *Redefining the identity of cardiac fibroblasts*.

Nat Rev Cardiol, 14, 484–491.

(16) Theall, B. & Alcaide, P. 2022. *The heart under pressure: immune cells in fibrotic remodeling*. Curr Opin Physiol, 25.

(17) Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., Castoldi, M., Soutschek, J., Koteliansky, V., Rosenwald, A., Basson, M. A., Licht, J. D., Pena, J. T., Rouhanifard, S. H., Muckenthaler, M. U., Tuschl, T., Martin, G. R., Bauersachs, J. & Engelhardt, S. 2008. *Microrna-21 contributes to myocardial disease by stimulating map kinase signalling in fibroblasts*. Nature, 456, 980–4.

(18) Travers, J. G., Kamal, F. A., Robbins, J., Yutzey, K. E. & Blaxall, B. C. 2016. *Cardiac fibrosis: the fibroblast awakens*. Circ Res, 118, 1021–40.

(19) Van Rooij, E., Sutherland, L. B., Thatcher, J. E., Dimaio, J. M., Naseem, R. H., Marshall, W. S., Hill, J. A. & Olson, E. N. 2008. *Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of mir-29 in cardiac fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 105, 13027–32.

EFICIENȚA ȘI DISEMINAREA CERCETĂRILOR

Lucrări publicate în reviste ISI – 2 autor principal

1. **Rusu-Nastase EG**, Lupan AM, Marinescu CI, Neculachi CA, Preda MB, Burlacu A. MiR-29a Increase in Aging May Function as a Compensatory Mechanism Against Cardiac Fibrosis Through SERPINH1 Downregulation. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2022 doi: 10.3389/fcvm.2021.810241. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2022): 3.6 (Q2)**
2. Lupan AM*, **Rusu EG***, Preda MB, Marinescu CI, Ivan C, Burlacu A. miRNAs generated from Meg3-Mirg locus are downregulated during aging. *Aging (Albany NY)*, 2021, doi: 10.18632/aging.203208 (* contribuții egale). **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2021): 5.682 (Q1)**

Manuscris în preparare: Rusu-Nastase EG, Marinescu CI, Neculachi CA, Preda MB, Martelli F, Burlacu A. MiR-10b activation in cardiac fibroblast attenuates the adverse cardiac remodelling after myocardial infarction during ageing by targeting Lpar2.

Lucrări publicate în reviste ISI – 5 co-autor

1. Laudy Cherry, Sinziana Popescu,&, Carmen Alexandra Neculachi, **Evelyn-Gabriela Nastase-Rusu**, Catalina Iolanda Marinescu-Colan, Bogdan Paul Cosman, Letitia Ciortan, Fabio Martelli, Maya Simionescu, Elena Butoi, Alexandrina Burlacu, Mihai Bogdan Preda. Mesenchymal stromal cells modulate neutrophil phenotype via paracrine signals. *Stem Cell Research & Therapy,* 2025. **Factorul de impact al revistei în anul precedent publicării (2024): 7.3 (Q1)**.

2. Neculachi CA, **Nastase-Rusu EG**, Cherry L, Marinescu-Colan CI, Tastsoglou S, Cosman BP, Popa AM, Panciuc C, Zaccagnini G, Catrina SB, Simionescu M, Martelli F, Preda MB, Burlacu A. miR-210 promotes the anti-inflammatory phenotype and M2 polarization in murine macrophages. *Frontiers in Immunology.* 2025; doi: 10.3389/fimmu.2025.1633163. **Factorul de impact al revistei în anul precedent publicării (2024): 5.9 (Q1)**.
3. Preda MB, **Nastase-Rusu EG**, Neculachi CA, Zhong X, Voellenkle C, Mazure NM, Balacescu O, Ivan C, Zheng XW, Gherghiceanu M, Lebrigand K, Simionescu M, Martelli F, Mari B, Catrina SB, Burlacu A, Ivan M. miR-210 locus deletion disrupts cellular homeostasis: an integrated genetic study. *Scientific Reports*.

2025;15(1):22659. doi: 10.1038/s41598-025-07572-8. **Factorul de impact al revistei în anul precedent publicării (2024): 3,9 (Q1)**.

4. Marinescu-Colan CI, **Nastase-Rusu EG**, Neculachi CA, Martelli F, Cherry L, Preda MB, Burlacu A. From cancer to heart fibrosis - GLIPR1 highlights a subset of myofibroblasts responsive to mesenchymal stem cell therapy after myocardial infarction. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2025; doi: 10.1016/j.biopha.2025.118087. **Factorul de impact al revistei în anul precedent publicării (2024): 7.5 (Q1)**.
5. Marinescu CI, Preda MB, Neculachi CA, **Rusu EG**, Popescu S, Burlacu A. Identification of a Hematopoietic Cell Population Emerging From Mouse Bone Marrow With Proliferative Potential *In Vitro* and Immunomodulatory Capacity. *Frontiers in Immunology*, 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.698070. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2021): 7,561(Q1)**
6. Preda MB, Lupan AM, Neculachi CA, Leti LI, Fenyo IM, Popescu S, **Rusu EG**, Marinescu CI, Simionescu M, Burlacu A. Evidence of mesenchymal stromal cell adaptation to local microenvironment following subcutaneous transplantation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine,* 2020, doi: 10.1111/ jcmm.15717. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2020): 5.310 (Q2)**

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale: 2 comunicări

1. **Rusu Evelyn-Gabriela.** Prezentare orală în cadrul simpozionului ”39th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology”. Natural aging process is associated with increased miR-29a and downregulated SERPINH1 in multiple organs, 21-23 Octombrie **2022**, Cluj, România- **prezentare orală câștigătoare a „Best Presentation Award” la secțiunea de ”PhD Students Presentations„**
2. **Rusu Evelyn-Gabriela.** Prezentare orală în cadrul simpozionului ”38th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology”. MiRNAs generated from Meg3-Mirg locus are downregulated during aging, 4-6 Noiembrie **2021**, București, România

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale: 5 comunicări

1. **Rusu E.G.,** Burlacu A. Evaluation of the imact of alginate-based scaffolds on the mesenchymal stem cell properties in vitro. The 10th National Congress With International Participation and 36th Annual Sciencific Session of RSCB, 5-9 Iunie **2018**, Craiova, România.

2. **Rusu E.G.,** Lupan A.M, Marinescu C.I, Preda B.M, Burlacu A. Influence of aging on the quality and dynamics of mouse cardiac fibroblasts in culture. European Research Area Network (ERA-Net) on Cardiovascular Diseases (ERA-CVD), 13-15 Mai **2019**, Riga, Letonia.
3. **Rusu E.G.,** Lupan A.M, Marinescu C.I, Preda B.M, Burlacu A. Influence of aging on the quality and dynamics of mouse cardiac fibroblasts in culture. International Cell Culture Under Flow Meeting 2020, 18-19 Februarie **2020**, Munich, Germania- **prezentare de poster câștigătoare a „Young Scientist Award".**
4. **Rusu E.G.,** Lupan A.M, Marinescu C.I, Preda B.M, Burlacu A. MiRNAs generated from Meg3-Mirg locus are downregulated during aging. 2nd Olympiad in Cardiovascular Medicine - International Symposium on Experimental and Clinical Cardiology, 27-30 Aprilie **2022**, Heraklion, Crete
5. **Rusu E.G.,** Lupan A.M, Preda B.M, Marinescu C.I, Neculachi C.A, Burlacu A. Natural aging process is associated with increased miR-29a and downregulated Serpinh1 in multiple organs. Final CardioRNA COST Action Meeting, 22-24 Aprilie **2023**, Nicosia, Cyprus.

Specializări și cursuri realizate pe perioada programului doctoral

1. Cursul internațional "CardioRNA Bioinformatics Training School" organizat de acțiunea COST CA17129 "CardioRNA", Nicosia, Cipru, 20-22 Februarie 2023.
2. Cursul internațional "10th International Course: Care and use of laboratory animals (Mice, Rats, Zebrafish)„ Creta, Grecia.

Premii câștigate

1. **Premiul " Young Scientist Award"** pentru posterul: **Rusu E.G.,** Lupan A.M, Marinescu C.I, Preda B.M, Burlacu A. Influence of aging on the quality and dynamics of mouse cardiac fibroblasts in culture, în cardul simpozionului "International Cell Culture Under Flow Meeting 2020", 18-19 Februarie **2020**, **Munich, Germania**
2. **Premiul " Best Presentation Award"** pentru prezentarea: **Rusu Evelyn-Gabriela.** Natural aging process is associated with increased miR-29a and downregulated SERPINH1 in multiple organs, în cadrul simpozionului "39th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology", 21-23 Octombrie **2022**, **Cluj, România**

FINANȚAREA CERCETĂRILOR ȘI COLABORĂRI ÎN PROIECTE DE CERCETARE

1. **Bursă de doctorat**: Academia Română (SCOSAAR): 2018-2021 (contract nr 88/04.11.2018)
2. **PNRR-III-C9-2022-I8-186 -** ”Targeting Cardiac Fibrosis in Heart Failure; Challenges and Potential Solutions Based on ncRNA Therapeutics (FibroThera)”, director de proiect Dr. Fabio Martelli, Director științific al Laboratorului de Cardiologie Moleculară, I.R.C.C.S. Policlinico San Donato
3. **PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0172 -** ”Targeting innate immune mechanisms to improve risk stratification and to identify future therapeutic options in myocardial infarction” (INNATE-MI), director de proiect Acad. Maya Simionescu (colaborator al echipei de implementare în 2022)
4. **PN-III-P4-ID-PCE-2020-1340 -** ”Mecanisme fundamentale ale remodelării ventriculare evaluate la nivelul populației de fibroblași cardiaci în miocardul bătrân cu infarct (Inf-OLD)”, director de proiect Dr. Alexandrina Burlacu
5. **PN-III-P1-1.1-TE-2019-1893** - ”MIR-210 genomic locus at the overlap between hypoxia signalling and inflammatory networks” (210-HINT), director de proiect Dr. Bogdan Preda
6. **COFUND-ERA-CVD-EXPERT-65/2017** -”Exploring new pathways in age-related heart diseases", ERA-CVD Joint Transnational Projects 2017-2020; (1) Hannover Medical School; (2) Maastricht University; (3) Humanitas Research Hospital; (4) Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III; (5) University of Lorraine; (6) Institute of Cellular Biology and Pathology (Responsabil: Dr. Alexandrina Burlacu)
7. **POC-A.1-A.1.1.4-E-2015** – ”Îmbunătățirea competitivității instituționale în domeniul diabetului de tip 1 prin dezvoltarea unui concept inovator de imunoterapie cu celule stromale mezenchimale (DIABETER)”, director de proiect Dr. Nadir Askenasy (Laboratorul Frankel de Transplant Experimental de Maduva Osoasa, din Centru Medical pentru Copii Schneider, Israel). Coordonator intern activități științifice: Dr. Alexandrina Burlacu.

ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie si Patologie Celulara „Nicolae Simionescu”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

TERAPIA CELULARĂ A ȚESUTULUI ISCHEMIC: TRANSPLANTUL COMBINAT DE CELULE STROMALE MEZENCHIMALE ȘI PROGENITOARE ENDOTELIALE

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
Academician Maya Simionescu

DOCTORAND:
Sinziana Popescu

București
2022

Cuvinte cheie: Terapie celulară, infarct miocardic, celule mezenchimale stromale, celule formatoare de colonii endoteliale, hidrogel, încapsulare celulară.

Număr total de pagini: 118

Număr de figuri în Partea I: 10

Număr de figuri originale în Partea a II-a: 21

Referințe bibliografice: 155

Lucrări publicate în reviste indexate ISI: 3 (1 – autor principal)

Rezumate publicate în reviste indexate ISI: 1

Lucrări in pregătire: 2

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale: 7 (4 – autor principal)

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale: 1

Premii naționale: 4

Specializări si cursuri efectuate pe durata programului doctoral: 5

Burse obținute pe durata programului doctoral: 2 (bursa doctorala de la Academia Romana si bursa Fulbright pentru cercetare)

Participarea la proiecte de cercetare naţionale: 3

CUPRINS

LISTA ABREVIERI ----- 1
INTRODUCERE SI OBIECTIVELE GENERALE ALE TEZEI DE DOCTORAT----- 4

PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTINTELOR ----- 7
I. 1. INFARCTUL MIOCARDIC ----- 7
I. 1. 1. Definiția Infarctului Miocardic ----- 8
I. 1. 2. Abordarea clinică ----- 10
I. 1. 3. Repararea cardiacă ----- 11
I. 1. 4. Vindecarea adversă ----- 16
I. 2. TERAPIA CELULARĂ ----- 18
I. 2. 1. Introducere ----- 18
I. 2. 2. Terapia celulară cardiacă ----- 21
I. 3. CELULELE STROMALE MEZENCHIMALE (MSC) ----- 25
I. 3. 1. Definiție și proprietăți ----- 25
I. 3. 2. Avantaje funcționale ----- 27
I. 3. 3. Rezultatele studiilor in vivo 30
I. 4. CELULELE FORMATOARE DE COLONII ENDOTELIALE (ECFC) ----- 32
I. 4. 1. Definiție și proprietăți ----- 32
I. 4. 2. Avantajele funcționale ale ECFC ----- 34
I. 4. 3. Rezultatele studiilor in vivo ----- 35
I. 5. INGINERIA TISULARĂ ----- 38
I. 5. 1. Direcții și potențial biomedical ----- 38
I. 6. HIDROGELURILE ----- 42
I. 6. 1. Origine, mecanisme de polimerizare și aplicații ----- 42

PARTEA II - CONTRIBUȚII ORIGINALE ----- 47

II. 1 - TERAPIA CELULARĂ COMBINATĂ AMELIOREAZĂ RECUPERAREA MIOCARDICĂ DUPĂ INFARCT PRIN MODULAREA RECIPROCĂ A FUNCȚIILOR MSC ȘI ECFC ----- 47
II. 1. 1. Introducere ----- 47
II. 1. 2. Metode: ----- 48
II. 1. 2. 1 Inducerea infarctului miocardic la șoareci ----- 48
II. 1. 2. 2 Analiza ecocardiografică ----- 49
II. 1. 2. 3. Urmărirea in vivo a celulelor transplantate ----- 50
II. 1. 2. 4. Culturi de celule ----- 50
II. 1. 2. 5. Verificarea potențialului de diferențiere osteo-adipo-chondro a MSC ----- 51
II. 1. 2. 6. Citometrie in flux ----- 52
II. 1. 2. 7. Caracterizarea dialogului molecular dintre MSC si ECFC: experimente de co-cultură ----- 52
II. 1. 2. 8. Colectarea și prepararea secretomului ----- 53

II. 1. 2. 9. Determinarea capacitații angiogene a secretomului: experimente in vitro pe Matrigel ----- 53
II. 1. 2. 10. Efectul MSC asupra organizării ECFC în structuri tubulare similare capilarelor ----- 54
II. 1. 2. 11. Experimente Proteome Profiler ----- 54
II. 1. 2. 12. Metoda ELISA ----- 54
II. 1. 2. 13. Reacția de polimerizare în lanț cantitativă în timp real (qRT-PCR) ----- 55
II. 1. 2. 14. Tehnica Western blot ----- 55
II. 1. 2. 15. Analiza statistică ----- 56
II. 1. 3. Rezultate ----- 56
II. 1. 3. 1. Caracterizarea structurală si funcțională a MSC umane ----- 56
II. 1. 3. 2. Transplantul dublu de MSC si ECFC îmbunătățește funcția cardiacă după infarctul miocardic experimental ----- 58
II. 1. 3. 3. Terapia celulară dual (MSC+ECFC) promovează expresia Conexinei 43 și a Integrinei alpha5 în inimile infarctizate ----- 60
II. 1. 3. 4. MSC si ECFC secretă factori angiogeni distincți. ----- 61
II. 1. 3. 5. Interacțiunea cu ECFC induce in MSC expresia receptorului la fibronectină ----- 65
II. 1. 3. 6. Contactul direct între MSC și ECFC stimulează secreția citokinelor ----- 67
II. 1. 4. Discuții ----- 71

II. 2 - OBȚINEREA ȘI TESTAREA UNEI MATRICI CITOCOMPATIBILE PENTRU ÎNCAPSULARE CELULARĂ ----- 74
II. 2. 1. Introducere ----- 74
II. 2. 2. Materiale si metode ----- 76
II. 2. 2. 1. Sinteza de gelatină metacrilată ----- 76
II. 2. 2. 2. Fabricarea hidrogelului ----- 76
II. 2. 2. 3. Caracterizarea mecanică a hidrogelului ----- 76
II. 2. 2. 4. Determinarea stabilității volumetrice și a degradării in vitro ----- 77
II. 2. 2. 5. Testarea adeziunii tisulare ----- 77
II. 2. 2. 6. Culturi celulare ----- 78
II. 2. 2. 7. Experimente de încapsulare celulară ----- 78
II. 2. 2. 8. Determinarea viabilității celulare prin metoda Live/Dead ----- 78
II. 2. 2. 9. Determinarea prezenței celulare în interiorul hidrogelului ----- 79
II. 2. 2. 10. Analiza statistică ----- 79
II. 2. 3. Rezultate ----- 80
II. 2. 3. 1. Funcționalizarea gelatinei permite foto-polimerizarea hidrogelului ----- 80
II. 2. 3. 2. Durata foto-polimerizării determină proprietățile mecanice ale hidrogelului ----- 81
II. 2. 3. 3. Stabilitatea volumetrică și degradarea in vitro a hidrogelului ----- 84

II. 2. 3. 4. Foto-polimerizarea hidrogelului în contact cu pielea determină adeziunea pe aceasta ----- 85
II. 2. 3. 5. Viabilitatea celulelor încapsulate in hidrogel ----- 86
II. 2. 3. 6. Structura internă a hidrogelului permite diseminarea celulelor în interiorul acestuia ----- 87
II. 2. 4. Discutii ----- 89

CONCLUZII GENERALE ----- 91
BIBLIOGRAFIE ----- 93
LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL ----- 114
COMUNICĂRI SUSȚINUTE LA MANIFESTĂRI ŞTIINŢIFICE INTERNAŢIONALE ŞI NAŢIONALE- AUTOR PRINCIPAL ----- 114
COMUNICĂRI SUSȚINUTE LA MANIFESTĂRI ŞTIINŢIFICE INTERNAŢIONALE ŞI NAŢIONALE – CO-AUTOR ----- 115
SPECIALIZĂRI ŞI CURSURI EFECTUATE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL ----- 116
PREMII OBŢINUTE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL ----- 116
BURSE OBȚINUTE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL ȘI FINANŢAREA CERCETĂRILOR ----- 117
COLABORATOR ÎN GRANTURI NAȚIONALE ȘI INTERNAȚIONALE: ----- 118

Introducere si obiectivele generale ale tezei de doctorat

Bolile cardiovasculare (BCV) reprezintă principala cauză de mortalitate la nivel global, cu peste 18.6 milioane de victime anual. Dintre acestea, mai mult de 80% se datorează bolii cardiace ischemice şi bolii cerebrovasculare. Deşi programele de informare a populației cu privire la factorii de risc şi prevenție se bucură de succes, incidența şi răspândirea acestor patologii sunt în continuă creștere (Roth et al., 2018). Povara bolilor cardiovasculare se resimte nu doar în calitatea vieții cetățenilor ci şi la nivel economic, având în vedere că numai în anul 2015 BCV au costat Uniunea Europeană peste 210 miliarde de euro (Elizabeth Wilkins, 2017).

Conform datelor Eurostat, în Romania aproximativ 58% dintre decesele înregistrate în anul 2016 s-au datorat BCV, cu o mai mare incidență în rândul femeilor (64.9%) decât în cazul bărbaților (51.6%). Factorul de risc medical cel mai răspândit este în prezent considerat a fi presiunea sistolică crescută, în timp ce alimentația necorespunzătoare reprezintă factorul comportamental principal asociat cu mortalitatea datorată BCV. Conform perspectivei medicale convenționale, fiziopatologia bolii ischemice cardiace este una multifactorială, având la bază disfuncția microvasculaturii coronariene, vasoconstricția severă, procese inflamatorii și/sau aterogene. Într-adevăr, deși instalarea treptată a ischemiei este favorizată de procesele tipice îmbătrânirii, atenția medicală se îndreaptă cel mai adesea către boala aterosclerotică și ocluzia arterelor coronare, aceasta culminând cu manifestarea infarctului miocardic acut (Elizabeth Wilkins, 2017; Severino et al., 2020).

Lezarea ischemică a miocardului se traduce în pierderea contractilității cardiomiocitelor și disfuncția mecanică, ducând în timp la insuficiență cardiacă. Considerând că inima are o capacitate de regenerare neglijabilă, cu un turn-over anual de doar 1-2% al cardiomiocitelor, sunt de dorit strategii care să inducă regenerarea și recuperarea funcțională a cordului (Hashimoto et al., 2018; Turner et al., 2020). Până în prezent capacitatea redusă de regenerare a cardiomiocitelor a fost abordată din multiple direcții, una dintre cele mai promițătoare căi fiind terapia celulară. Aceasta presupune administrarea directă de celule vii unui pacient, cel mai adesea prin injectare, cu scopul de a obține un efect terapeutic. Printre mecanismele benefice care pot fi declanșate cu ajutorul terapiei celulare se numără regenerarea tisulară, restabilirea unor funcții biologice compromise și creșterea capacității corpului de a combate infecții (Wang et al., 2021). Numeroase studii preclinice au consolidat potențialul terapiei celulare în procesul de recuperare miocardică post-infarct, fapt ce a

accelerat tranziția către testele clinice. Totuși, până în prezent rezultatele studiilor clinice au sugerat că grefarea ineficientă a celulelor transplantate la situsul lezat este un neajuns considerabil al terapiilor cu celule vii, acest lucru limitând în timp efectele benefice induse de celulele administrate (Fernández-Avilés et al., 2017; Pittenger et al., 2019). Din acest motiv, nevoia de a dezvolta o terapie eficientă rămâne de actualitate și reprezintă ținta multor abordări biomedicale inovative. Acestea se înscriu în sfera ingineriei tisulare și utilizează celule, biomateriale precum și arhitecturi complexe obținute prin tehnologia printării 3D. Cel mai probabil, prin progresul acestor domenii distincte se vor putea contura noi soluții pentru tratamentul afecțiunilor cardiovasculare.

Dat fiind impactul infarctului miocardic asupra populației globale, lucrarea de față și-a propus dezvoltarea unei strategii celulare pentru a facilita recuperarea cardiacă post-infarct. Ipoteza principală care a stat la baza cercetărilor a fost că administrarea simultană a două tipuri celulare, remarcate individual pentru proprietățile lor reparatoare, poate produce efecte benefice superioare mono-terapiilor.

De asemenea, în încercarea de a dezvolta pe viitor o structură 3D compatibilă cu încapsularea celulară, am optimizat formularea unui hidrogel care să poată fi aplicat ulterior în ingineria tisulară.

Structura tezei de doctorat

Lucrarea este structurată în două părți: prima dintre acestea, intitulată „Stadiul actual al cunoștințelor", descrie aspecte recente referitoare la bolile cardiovasculare, infarctul miocardic și terapia celulară, cu accent pe celulele stromale mezenchimale (MSC) și celulele formatoare de colonii endoteliale (ECFC), acestea reprezentând cele două tipuri celulare utilizate în partea experimentală. De asemenea, sunt expuse pe larg conceptele esențiale din domeniul ingineriei tisulare și al hidrogelurilor.

Cea de-a doua parte a tezei cuprinde contribuții originale și este împărțită în două studii majore.

Primul studiu, intitulat "**Terapia celulară combinată ameliorează recuperarea miocardică după infarct prin modularea reciprocă a funcțiilor MSC și ECFC**" a investigat potențialul terapeutic al celulelor mezenchimale stromale în prezența celulelor formatoare de colonii endoteliale. Acest prim studiu a avut două obiective principale:

1. Evaluarea eficienței dublului transplant MSC+ECFC comparativ cu mono-transplantul MSC in a restabili funcția cardiacă la șoarecii cu infarct miocardic indus;
2. Investigarea mecanismelor moleculare prin care ECFC modulează MSC și viceversa.

Pentru a îndeplini obiectivele acestui studiu am utilizat atât modele experimentale in vitro cât și un model animal de infarct miocardic, realizat pe șoareci. Experimentele au presupus tehnici de biochimie precum ELISA și Western blotting, tehnici de biologie moleculară precum qRT-PCR, studii pe culturi de celule și caracterizarea acestora prin citometrie în flux. Descrierea amănunțită a protocoalelor poate fi regăsită în secțiunea „Materiale și metode" aferentă acestui capitol al tezei de doctorat.

Rezultatele originale obținute în acest studiu au demonstrat că:

- Dublul transplant de MSC și ECFC îmbunătățește funcția cardiacă după infarctul miocardic, comparativ cu terapia bazată doar pe MSC;
- Terapia celulară dual (MSC+ECFC) promovează expresia Conexinei 43 și a Integrinei alpha5 în inimile infarctizate, sugerând o integrare superioară a celulelor în matricea extracelulară;
- MSC și ECFC prezintă profiluri secretorii distincte, cu efect angiogen;
- Interacțiunea cu ECFC induce în MSC expresia receptorului la fibronectină, indicând o abilitate îmbunătățită a celulelor co-transplantate de a se grefa în țesutul gazdă;
- Contactul direct între MSC și ECFC modulează activitatea lor secretoare, în special la nivelul factorilor de creștere și al citokinelor implicate în angiogeneza, în organizarea matrixului extracelular și în răspunsul inflamator.

Aceste rezultate dovedesc eficiența unei abordări duale în ceea ce privește terapia celulară a miocardului post-infarct, prin modularea reciprocă a proprietăților benefice caracteristice fiecărui tip celular utilizat. Această concluzie confirmă ipoteza inițială, anume aceea că utilizarea simultană a MSC și ECFC, recunoscute individual pentru potențialul lor reparator, are efecte benefice superioare mono-terapiei bazată pe MSC.

Datele originale, cuprinse in primul studiu al prezentei teze de doctorat, s-au concretizat in articolul intitulat „Dual Stem Cell Therapy Improves the Myocardial Recovery Post-Infarction through Reciprocal Modulation of Cell Functions", autori S. Popescu, M.B. Preda, C.I. Marinescu, M. Simionescu, A. Burlacu., publicat în revista International Journal of Molecular Sciences. 2021 May 26;22(11):5631. doi: 10.3390/ijms22115631. (Factor de impact: 5.92, Q1). Articolul a fost premiat în anul 2021 de catre UEFISCDI.

Cel de-**al doilea studiu** cuprins în secțiunea „Contribuții originale" a tezei de doctorat este intitulat „**Obținerea și testarea unei matrici citocompatibile pentru încapsulare celulară**" si a avut ca obiectiv includerea celulelor mezenchimale stromale în structura 3D a unui hidrogel foto-polimerizabil, acesta având aplicabilitate biomedicală. Acest studiu a fost efectuat în cadrul unui stagiu de cercetare Fulbright, în Departamentul de Inginerie Chimica si Biomoleculară al Universității din California, Los Angeles.

Pentru a realiza acest obiectiv am folosit metode chimice de sinteză și polimerizare a hidrogelului, teste mecanice pentru caracterizarea proprietăților acestuia precum și experimente pe culturi de celule pentru a valida cito-compatibilitatea matricei obținute. Detaliile specifice acestor experimente pot fi regăsite în secțiunea „Materiale și metode" aferentă acestui capitol al tezei de doctorat.

Rezultatele obținute în acest studiu au aratat că:

- Funcționalizarea gelatinei cu grupări metacril permite foto-polimerizarea hidrogelului într-un proces controlat din exterior și dependent de expunerea la lumină;
- Durata foto-polimerizării determină proprietățile mecanice ale hidrogelului, într-o relație de proporționalitate directă;
- Hidrogelul obținut este stabil din punct de vedere al degradării în condiții apoase;
- Foto-polimerizarea hidrogelului în contact cu pielea determină adeziunea pe aceasta, un parametru important pentru aplicabilitatea in vivo a biomaterialelor;
- Hidrogelul obținut este înalt citocompatibil iar celulele încapsulate în acesta au o viabilitate înaltă pe parcursul primelor 5 zile de încapsulare;
- Structura internă a hidrogelului permite diseminarea celulelor în interiorul acestuia, o proprietate esențială a matricilor utilizate in încapsulare celulară.

Datele originale cuprinse in acest studiu fac parte dintr-un articol în curs de publicare în colaborare.

În concluzie, rezultatele originale obținute în prezenta teză de doctorat indică o eficiență in vivo superioară a terapiei celulare duale MSC+ECFC comparativ cu mono-terapia bazată pe MSC. Mai mult decât atât, datele indică o reglare reciprocă a celor două tipuri celulare, cu

efectul ultim de stimulare a abilitații de grefare a MSC precum și a proceselor reparatoare individuale. Rezultatele obținute în cel de-al doilea studiu demonstrează versatilitatea hidrogelului foto-polimerizat și compatibilitatea acestuia cu încapsularea MSC, indicând aplicabilitatea sa biomedicală.

Aceste studii confirmă si extind potențialul uriaș al terapiilor celulare în medicina regenerativă și impactul pe care l-ar putea avea în lupta contra bolilor cardiovasculare.

Perspective

In momentul actual există o nevoie considerabilă de soluții terapeutice care să reverseze efectele dramatice ale infarctului miocardic asupra arhitecturii și funcției cardiace, încetinind astfel tranziția către insuficiența cardiacă. Cu obiectivul principal de a contribui la regenerarea cardiacă, în ultimii ani s-au înregistrat progrese semnificative atât în biomedicină cât și în domenii aparent îndepărtate.

Printr-o abordare interdisciplinară, îmi propun continuarea studiului privind terapia celulară duala MSC+ECFC și reunirea acesteia cu hidrogelul optimizat în cea de-a doua parte a tezei. Astfel, va fi posibilă testarea celulelor administrate in vivo sub forma încapsulată, ca patch, comparativ cu injecția clasică de suspensie celulară și determinarea metodei de livrare optime. De asemenea, anticipez experimente de încapsulare in vitro utilizând MSC și ECFC care să pună în evidență nu doar abilitățile secretorii ale celor două tipuri celulare, dar și capacitatea acestora de a se dispune în structuri asemănătoare țesuturilor native.

Asemenea rezultate vor putea stabili dacă administrarea celulelor într-un suport 3D protector este suficient de avantajoasă pentru a putea prelungi în timp eficiența terapiilor celulare.

Contributii personale

Lista lucrărilor publicate şi comunicate pe durata programului doctoral

Lucrare publicată într-o revistă indexată ISI – autor principal

S. Popescu, M.B. Preda, C.I. Marinescu, M. Simionescu, A. Burlacu. Dual Stem Cell Therapy Improves the Myocardial Recovery Post-Infarction through Reciprocal Modulation of Cell Functions. Int J Mol Sci. 2021 May 26;22(11):5631. doi: 10.3390/ijms22115631. (Factor de impact: 5.92, Q1)

Lucrări publicate în reviste indexate ISI – co-autor

M.B. Preda, A.M. Lupan, C.A. Neculachi, L.I. Leti, I.M. Fenyo, S. Popescu, E.G. Rusu, C.I. Marinescu, M. Simionescu, A. Burlacu. Evidence of mesenchymal stromal cell adaptation to local microenvironment following subcutaneous transplantation. J Cell Mol Med. 2020 Aug 12;24(18):10889–97. doi: 10.1111/jcmm.15717. (Factor de impact: 5.31, Q2)

C.I. Marinescu, M.B. Preda, C.A. Neculachi, E.G. Rusu, S. Popescu, A. Burlacu. Identification of a Hematopoietic Cell Population Emerging From Mouse Bone Marrow With Proliferative Potential In Vitro and Immunomodulatory Capacity. Front. Immunol. 2021 12:698070. doi: 10.3389/fimmu.2021.698070 (Factor de impact: 7.56, Q1)

Rezumat publicat într-o revistă indexată ISI

S. Popescu, A.M. Lupan, M.B. Preda, M. Simionescu, A. Burlacu, "Dual stem cell therapy improves the cardiac function after experimental myocardial infarction". Circulation Research. 2020;127:A492, DOI: 10.1161/res.127.suppl_1.492 (Factor de impact: 17.36, Q1)

Comunicări susținute la manifestări ştiinţifice internaţionale şi naţionale - autor principal

S. Popescu, M.A. Publik, B. M. Preda, „A novel neutrophil-like in vitro model for the study of human neutrophil polarization".The 38th International Conference and Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology, 4-6 Noiembrie 2021. Eveniment virtual – prezentare poster

S. Popescu, AM Lupan, M.B. Preda, M. Simionescu, A. Burlacu, "Dual stem cell therapy improves the cardiac function after experimental myocardial infarction". American Heart

Association Basic Cardiovascular Science Scientific Sessions 2020. July 27–30, 2020. Virtual Event. - Prezentare poster

S. Popescu, AM Lupan, M.B. Preda, A. Burlacu, M. Simionescu "Cross-talk between Mesenchymal Stromal Cells and Endothelial Progenitors modulates the expression of angiogenesis related molecules" - The 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 10th National Congress with International participation, 2018, Craiova, Romania –Prezentare orala

S. Popescu, M.B. Preda, A. Burlacu. "Assessment of the proper ratio between endothelial progenitor cells and mesenchymal stromal cells that confers superior angiogenic effects in vitro". 9th National Congress with International Participation and 35th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology, 06 -12 iunie 2017, Iasi, Romania – Prezentare poster

S. Popescu, M.B. Preda, A. Burlacu "Assessment of the proper ratio between endothelial progenitor cells and mesenchymal stromal cells that confers superior angiogenic effects in vitro" European Society of Cardiology " Basic Science Summer School", 17-25 Iunie 2017, Nisa, Franta – Prezentare poster

Comunicări susținute la manifestări ştiinţifice internaţionale şi naţionale – co-autor

M.B. Preda, S. Popescu, R. Tutuianu, A.M. Rosca, M. Simionescu, A. Burlacu. "Hypoxia regulates the pro-angiogenic effect of subcutaneously transplanted mesenchymal stromal cells." EMBO Conference: The Molecular and Cellular Basis of Regeneration and Tissue Repair. 15-19 September 2018. Valetta, Malta;

M.B. Preda, S. Popescu, R. Tutuianu, A.M. Rosca, M. Simionescu, A. Burlacu. "Hypoxia regulates the pro-angiogenic effect of subcutaneously transplanted mesenchymal stromal cells." Keystone Symposia meeting on Therapeutic Targeting of Hypoxia-Sensitive Pathways. 10-14.04.2018. University of Oxford Mathematical Institute, Oxford, UK.

M.B. Preda, S. Popescu, R. Tutuianu, A.M. Rosca, M. Simionescu, A. Burlacu. "Hypoxia regulates the pro-angiogenic effect of subcutaneously transplanted mesenchymal stromal cells." INTERNATIONAL COURSE & ISRMS 2nd CONGRESS, June 14-17, 2017, Bucharest, Romania.

Specializări şi cursuri efectuate pe durata programului doctoral

2021 - Workshop virtual: "Cell-Matrix Interaction and Mechanobiology in Regenerative Medicine", Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society, 10-11 Iunie 2021

2019 - "Micro- and Nanotechnologies for Medicine Workshop: Emerging Frontiers and Applications", University of California, Los Angeles, Los Angeles, SUA 8-12 Iulie, 2019

2019 – "Molecular Basis of Vascular Biology" Course (MCD BIO 224-1), University of California, Los Angeles, Los Angeles, SUA, Martie – Iunie 2019

2018 – Certificare TOEFL - English Language ibt Test: scor 106/110

2017 - "Techniques to validate the isolation of adipose derived stem cells and their differentiation evaluation" Course – the Second Congress of the International Society of Regenerative Medicine and Surgery (ISRMS), 14-17 Iunie, 2017, Bucuresti, Romania

Premii obţinute pe durata programului doctoral

2021 - UEFISDCI PN-III-P1-1.1-PRECISI-2021 - Premierea rezultatelor cercetării - articole - S. Popescu, M.B. Preda, C.I. Marinescu, M. Simionescu, A. Burlacu. Dual Stem Cell Therapy Improves the Myocardial Recovery Post-Infarction through Reciprocal Modulation of Cell Functions. Int J Mol Sci. 2021 May 26;22(11):5631. doi: 10.3390/ijms22115631. (Factor de impact: 5.92)

2021 - UEFISDCI PN-III-P1-1.1-PRECISI-2021 - Premierea rezultatelor cercetării – articole - C.I. Marinescu, M.B. Preda, C.A. Neculachi, E.G. Rusu, S. Popescu, A. Burlacu. Identification of a Hematopoietic Cell Population Emerging From Mouse Bone Marrow With Proliferative Potential In Vitro and Immunomodulatory Capacity. Front. Immunol. 2021 12:698070. doi: 10.3389/fimmu.2021.698070 (Factor de impact: 7.56)

2020 - UEFISDCI PNCDI III - Premierea rezultatelor cercetării - articole - M.B. Preda, A.M. Lupan, C.A. Neculachi, L.I. Leti, I.M. Fenyo, S. Popescu, E.G. Rusu, C.I. Marinescu, M. Simionescu, A. Burlacu. Evidence of mesenchymal stromal cell adaptation to local microenvironment following subcutaneous transplantation. J Cell Mol Med. 2020 Aug 12;24(18):10889–97. doi: 10.1111/jcmm.15717. (Factor de impact: 5.31)

2020 – American Heart Association Basic Cardiovascular Science Scientific Sessions 2020: Paul Dudley White International Scholar Award for the Highest Ranked Abstract from Romania

2018 – Premiul pentru cea mai buna prezentare orala (Locul 3) - "The 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 10th National Congress with International participation", 2018, Craiova, Romania

Burse obținute pe durata programului doctoral și finanţarea cercetărilor

2018 - 2019 - Bursa de cercetare - Fulbright Student Award to the United States

2016 - 2019 - Bursa de studii doctorale - Şcoala de Studii Avansate a Academiei Române

Colaborator în granturi naționale și internaționale:

INNATE-MI PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0172: Targeting innate immune mechanisms to improve risk stratification and to identify future therapeutic options in myocardial infarction.

Co-SuSTaIn PN-III-P2-2.1-PED-2016-1881: Consolidating the Subcutaneous Transplantation of Mesenchymal Stem Cells as a Warranted Therapy for Myocardial Infarction.

ComTIsM PN-II-RU-TE-2014-Contract 83/2014 Ingineria tesutului ischemic prin transplant combinatorial: asamblarea pieselor ce induc atat supravietuirea grefei cat si repararea tesutului gazda.

Bibliografie

Elizabeth Wilkins. (2017). European Cardiovascular Disease Statistics 2017 edition. In R. L.-F. and R. B. Jose Leal (Ed.), *European Heart Network*. British Heart Foundation Centre on Population Approaches for Non-Communicable Disease Prevention.

Fernández-Avilés, F., Sanz-Ruiz, R., Climent, A. M., Badimon, L., Bolli, R., Charron, D., Fuster, V., Janssens, S., Kastrup, J., Kim, H.-S., Lüscher, T. F., Martin, J. F., Menasché, P., Simari, R. D., Stone, G. W., Terzic, A., Willerson, J. T., Wu, J. C., Fernández-Avilés, F., … Ylä-Herttuala, S. (2017). Global position paper on cardiovascular regenerative medicine. *European Heart Journal*, *38*(33), 2532–2546. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx248

Hashimoto, H., Olson, E. N., & Bassel-Duby, R. (2018). Therapeutic approaches for cardiac regeneration and repair. *Nature Reviews Cardiology*, *15*(10), 585–600. https://doi.org/10.1038/s41569-018-0036-6

Pittenger, M. F., Discher, D. E., Péault, B. M., Phinney, D. G., Hare, J. M., & Caplan, A. I. (2019). Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *Npj Regenerative Medicine*, *4*(1), 22. https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6

Roth, G. A., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., Abbasi, N., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., Abdollahpour, I., Abdulkader, R. S., Abebe, H. T., Abebe, M., Abebe, Z., Abejie, A. N., Abera, S. F., Abil, O. Z., Abraha, H. N., … Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, *392*(10159), 1736–1788. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7

Severino, P., D'amato, A., Pucci, M., Infusino, F., Adamo, F., Birtolo, L. I., Netti, L., Montefusco, G., Chimenti, C., Lavalle, C., Maestrini, V., Mancone, M., Chilian, W. M., & Fedele, F. (2020). Ischemic heart disease pathophysiology paradigms overview: From plaque activation to microvascular dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21), 1–30. https://doi.org/10.3390/ijms21218118

Turner, D., Rieger, A. C., Balkan, W., & Hare, J. M. (2020). Clinical-based Cell Therapies for Heart Disease—Current and Future State. *Rambam Maimonides Medical Journal*, *11*(2), e0015. https://doi.org/10.5041/RMMJ.10401

Wang, L. L., Janes, M. E., Kumbhojkar, N., Kapate, N., Clegg, J. R., Prakash, S., Heavey, M. K., Zhao, Z., Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2021). Cell therapies in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine*, *6*(2), 1–36. https://doi.org/10.1002/btm2.10214

ACADEMIA ROMÂNĂ

Școala de Studii Avansate a Academiei Române

Institutul de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

IDENTIFICAREA ŞI UTILIZAREA FACTORILOR SECRETAŢI DE CELULE CU ORIGINE MEZENCHIMALĂ ÎN TERAPIA RĂNILOR CUTANATE: STUDII *IN VITRO* ŞI *IN VIVO*

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

Acad. Maya Simionescu

DOCTORAND:

Daniela-Mădălina Iacomi (Gheţu)

Bucureşti

2025

Cuvinte-cheie: răni cutanate cronice, medicină regenerativă, celule stromale mezenchimale, imortalizare, fibroblaste, secretom, cultura tridimensională, vindecarea rănilor, re-epitelizare, angiogeneză

Număr total de pagini – 249

Număr de figuri în Partea I – 15

Număr de tabele în Partea I – 5

Număr de figuri în Partea a II-a – 99

Număr de tabele în Partea a II-a – 3

Număr de referințe bibliografice – 338

Lucrări publicate în jurnale internaționale indexate ISI în perioada stagiului de doctorat – 4 (3 în calitate de autor principal, una în calitate de co-autor)

Număr de lucrări în pregătire – 2 (autor principal)

Capitole de carte – 1

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – 2

Postere prezentate la manifestări științifice naţionale şi internaționale – 7 (3 în calitate de autor principal)

Stagii internaționale efectuate în timpul programului doctoral – 1

Participări la cursuri şi seminarii în perioada stagiului de doctorat – 7

Premierea de către UEFISCDI a rezultatelor cercetării: 2

Brevete naționale înregistrate – 1 (depus)

Burse obținute în cadrul programului de formare doctorală și finanțarea activității de cercetare – 2 (bursă doctorală de la Academia Română, bursă de la Ministerul Educației pentru un stagiu internațional de cercetare)

Participarea la granturi de cercetare naționale – 4

Participarea la granturi de cercetare internaționale – 2

CUPRINS

LISTĂ DE ABREVIERI 9

INTRODUCERE ŞI OBIECTIVELE GENERALE ALE TEZEI 14

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAŞTERII 18

I.1. RĂNILE CUTANATE: FUNDAMENTE ANATOMICE, FIZIOLOGICE ŞI ABORDĂRI TERAPEUTICE ACTUALE 19

I.1.1. Structura şi fiziologia pielii 19

I.1.1.1. Epidermă 20

I.1.1.2. Derm 24

I.1.1.3. Hipoderm 27

I.1.1.4. Structurile anexe ale pielii 27

I.1.2. Etapele vindecării rănilor cutanate 29

I.1.2.1. Hemostaza 30

I.1.2.2. Inflamaţia 32

I.1.2.3. Proliferarea 33

I.1.2.4. Remodelarea 34

I.1.3. Perturbarea procesului fiziologic de vindecare în cazul rănilor cronice cutanate 34

I.1.4. Abordări terapeutice actuale ale rănilor cronice cutanate 37

I.2. CONTRIBUŢIA SECRETOMULUI PROVENIT DE LA CELULELE STROMALE MEZENCHIMALE (MSC) ÎN PROCESUL DE VINDECARE AL RĂNILOR CUTANATE 41

I.2.1. Caracteristicile MSC 41

I.2.2. Compoziţia secretomului provenit de la MSC 43

I.2.2.1. Factori solubili 44

I.2.2.2. Vezicule extracelulare 46

I.2.3. Metode de îmbunătăţire a activităţii secretomului 48

I.2.3.1. Cultura celulelor în condiţii hipoxice 49

I.2.3.2. Cultura tridimensională (3D) a celulelor 51

I.2.3.3. Tratamentul celulelor cu diverse molecule inflamatorii 54

I.2.4. Secretomul provenit de la MSC – o potenţială terapie pentru rănile cutanate 55

I.3. UTILIZAREA FIBROBLASTELOR CA ALTERNATIVĂ A MSC 59

I.3.1. Similitudinea dintre fibroblaste şi MSC 59

I.3.2. Utilizarea secretomului provenit de la fibroblaste în terapia rănilor cutanate.. 60

I.3.2.1. Studii *in vitro* 60

I.3.2.2. Studii *in vivo* 67

I.4. METODE PENTRU OBŢINEREA UNEI SURSE INEPUIZABILE DE CELULE MEZENCHIMALE 69

I.4.1. Imortalizarea celulelor mezenchimale 69

I.4.2. Obţinerea celulelor mezenchimale din celule stem pluripotente induse..... 77

II. CONTRIBUŢII ORIGINALE 80

II.1. OBŢINEREA ŞI CARACTERIZAREA MSC UMANE DERIVATE DIN MĂDUVA OSOASĂ ŞI DIN ŢESUTUL ADIPOS, PRECUM ŞI A FIBROBLASTELOR DERMALE UMANE PRIMARE SAU OBŢINUTE DIN CELULE STEM PLURIPOTENTE INDUSE UMANE 81

II.1.1. Introducere şi obiective 81

II.1.2. Materiale şi metode 81

II.1.2.1. Izolarea MSC umane din măduva osoasă 81

II.1.2.2. Izolarea MSC umane din ţesutul adipos 82

II.1.2.3. Izolarea fibroblastelor dermale primare 83

II.1.2.4. Obţinerea fibroblastelor dermale prin diferenţierea celulelor stem pluripotente induse umane 84

II.1.2.5. Microscopia electronică de transmisie (TEM) 85

II.1.2.6. Analiza imunofenotipică prin tehnica de citometrie în flux 86

II.1.2.7. Imagistică de fluorescenţă 87

II.1.2.8. Analiza potenţialului de diferenţiere către linia adipogenă, osteogenă şi condrogenă 88

II.1.3. Rezultate 88

II.1.3.1. Obţinerea culturilor pure de MSC primare umane derivate din măduva osoasă şi din ţesutul adipos, precum şi de fibroblaste dermale umane primare 88

II.1.3.2. În cultură, MSC primare umane derivate din măduva osoasă şi din ţesutul adipos, precum şi fibroblastele dermale umane primare exprimă markerii celulari de suprafaţă specifici şi au potenţial de diferenţiere către linia adipogenică, osteogenă şi condrogenică 92

II.1.3.3. Caracterizarea fibroblastelor dermale obţinute prin diferenţierea celulelor stem pluripotente induse umane 94

II.1.4. Discuţii şi concluzii parţiale..... 98

II.2. TESTAREA *IN VITRO* A SECRETOMULUI PROVENIT DE LA O LINIE IMORTALIZATĂ DE MSC DERIVATE DIN ŢESUT ADIPOS (ADSC) URMĂRIND EFECTUL ASUPRA PROCESELOR IMPLICATE ÎN VINDECAREA RĂNILOR CUTANATE..... 99

II.2.1. Introducere şi obiective..... 99

II.2.2. Materiale şi metode..... 100

II.2.2.1. Culturi celulare..... 100

II.2.2.2. Design experimental pentru obţinerea subpopulaţiei clonale de ADSC101

II.2.2.3. Cinetica proliferării celulare..... 102

II.2.2.4. Teste de diferențiere multilinie..... 102

II.2.2.5. Cariotiparea subpopulaţiei clonale de celule imortalizate..... 103

II.2.2.6. Analiza expresiei proteice prin Western Blot..... 104

II.2.2.7. Producerea, colectarea şi păstrarea secretomului..... 104

II.2.2.8. Testarea viabilităţii celulare..... 104

II.2.2.9. Testarea proliferării celulare..... 105

II.2.2.10. Evaluarea migrării celulare prin metoda zgârierii monostratului celular („Scratch test”)..... 105

II.2.2.11. Evaluarea în timp real a chemotaxiei folosind sistemul xCELLigence... 105

II.2.2.12. Testul capacităţii de angiogeneză pe Matrigel..... 106

II.2.2.13. Detecția factorilor angiogeni utilizând kit-ul Angiogenesis Array... 106

II.2.2.14. Evaluarea re-epitelizării utilizând un model *in vitro* de cultură organotipică..... 106

II.2.2.15. Coloraţia Hematoxilină-Eozină..... 107

II.2.2.16. Analiza statistică..... 107

II.2.3. Rezultate..... 107

II.2.3.1. Caracterizarea subpopulaţiei clonale de ADSC imortalizate cu hTERT.. 107

II.2.3.2. Factorii eliberați în secretom (mediul condiționat) de către subpopulația clonală de ADSC transduse cu hTERT au o capacitate mare de a susține viabilitatea, proliferarea și migrarea keratinocitelor și a fibroblastelor dermale 110

II.2.3.3. Secretomul derivat de la subpopulația clonală de ADSC transdusă cu hTERT are proprietăți pro-angiogene.....114

II.2.3.4. Secretomul derivat de la subpopulația clonală de ADSC transdusă cu hTERT stimulează re-epitelizarea rănii realizate pe o cultură organotipică de piele 118

II.2.4. Discuții și concluzii parțiale 119

II.3. STUDIU COMPARATIV PRIVIND PROPRIETĂȚILE FIBROBLASTELOR DERMALE UMANE ŞI A MSC UMANE DERIVATE DIN MĂDUVA OSOASĂ CULTIVATE ÎN SISTEM BI- (2D) ŞI TRIDIMENSIONAL (3D) 123

II.3.1. Introducere şi obiective 123

II.3.2. Materiale şi metode 124

II.3.2.1. Celule utilizate în studiu 124

II.3.2.2. Model de cultură celulară 3D 124

II.3.2.3. Coloraţia Hematoxilină-Eozină 125

II.3.2.4. Detecţia prin imunofluorescenţă a F-actinei 125

II.3.2.5. Microscopia electronică de transmisie (TEM) 126

II.3.2.6. Coloraţia Anexină-PI 126

II.3.2.7. Analiza imunofenotipică prin tehnica de citometrie în flux 127

II.3.2.8. Analiza potențialului de diferențiere către linia adipogenă, osteogenă și condrogenă 128

II.3.2.9. Imagistică de fluorescenţă 128

II.3.2.10. Analiza expresiei proteice prin Western Blot 129

II.3.2.11. Analiza statistică 130

II.3.3. Rezultate 130

II.3.3.1. Caracterizarea comparativă a fibroblastelor dermale primare şi a MSC derivate din măduva osoasă cultivate în sistem 3D şi 2D din punct de vedere al morfologiei şi al menținerii proprietăților definitorii de MSC 130

II.3.3.2. Fibroblastele dermale primare și MSC derivate din măduva osoasă își mențin viabilitatea în culturi 3D 141

II.3.3.3. Evidențierea modificărilor de secreție a componentelor matricii extracelulare şi de exprimare a moleculelor de adeziune celulară prin cultivarea 3D a fibroblastelor dermale primare şi a MSC derivate din măduva osoasă...143

II.3.3.4. Menținerea markerilor de suprafață specifici în urma cultivării fibroblastelor dermale obținute prin diferențierea celulelor stem pluripotente induse în sistem 3D 151

II.3.4. Discuții și concluzii parțiale 153

II.4. TESTAREA *IN VITRO* A EFECTULUI SECRETOMULUI PROVENIT DE LA FIBROBLASTELE DERMALE PRIMARE ŞI DE LA FIBROBLASTELE DERIVATE

DIN CELULELE STEM PLURIPOTENTE INDUSE UMANE CULTIVATE ÎN SISTEM 2D ŞI 3D ASUPRA PROCESELOR IMPLICATE ÎN VINDECAREA RĂNILOR CUTANATE 158
II.4.1. Introducere şi obiective 158
II.4.2. Materiale şi metode 159
II.4.2.1. Celule utilizate în studiu 159
II.4.2.2. Producerea, colectarea şi păstrarea secretomului 159
II.4.2.3. Testarea proliferării celulare 161
II.4.2.4. Testarea proliferării celulare în timp real 161
II.4.2.5. Evaluarea migrării keratinocitelor şi a fibroblastelor prin intermediul metodei zgârierii monostratului („Scratch test") 162
II.4.2.6. Evaluarea în timp real a chemotaxiei folosind sistemul xCELLigence..... 162
II.4.2.7. Analiza expresiei genice prin tehnica qRT-PCR 162
II.4.2.8. Analiza Western Blot 164
II.4.2.9. Evaluarea migrării celulelor endoteliale microvasculare prin intermediul metodei zgârierii monostratului celular („Scratch test") 164
II.4.2.10. Formarea structurilor asemănătoare capilarelor în Matrigel..... 165
II.4.2.11. Detecţia factorilor angiogeni utilizând „Angiogenesis Array Kit" .. 165
II.4.2.12. Detecţia citokinelor cu ajutorul kit-urilor de tip array..... 166
II.4.2.13. Testul ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 166
II.4.2.14. Testarea viabilităţii celulare 167
II.4.2.15. Model de rană realizată pe un model de cultură organotipică de piele 167
II.4.2.16. Model de rană realizată pe un echivalent de piele obţinut din organoizi derivaţi din celule stem pluripotente induse umane 168
II.4.2.17. Coloraţia „Whole Mount" 169
II.4.2.18. Analiza statistică 170
II.4.3. Rezultate 170
II.4.3.1. Efectul secretomului asupra proliferării keratinocitelor și a fibroblastelor 170
II.4.3.2. Efectul secretomului asupra migrării keratinocitelor și a fibroblastelor.. 172
II.4.3.3. Efectul chemoatractiv a secretomului asupra keratinocitelor și a fibroblastelor 174

II.4.3.4. Evaluarea capacității fibroblastelor de a sintetiza componente ale matricii extracelulare 176

II.4.3.5. Efectul secretomului asupra migrării și chemoatracției celulelor endoteliale și a capacității de formare a structurilor asemănătoare capilarelor pe Matrigel 180

II.4.3.6. Identificarea și cuantificarea factorilor pro-angiogeni eliberați în cultura 2D, în comparație cu cultura 3D 183

II.4.3.7. Evaluarea funcțională *in vitro* a proprietăților anti-inflamatorii ale secretomului recoltat de la sferoizi derivați din fibroblaste 184

II.4.3.8. Efectul pro-reparativ al secretomului demonstrat pe un model de rană al unei culturi organotipice de piele 189

II.4.3.9. Testarea efectului secretomului provenit de la fibroblastele diferențiate din celule stem pluripotente induse umane asupra rănilor generate pe echivalenți de piele derivați din organoizi 191

II.4.4. Discuții şi concluzii parțiale 194

II.5. TESTAREA *IN VIVO* A SECRETOMULUI PROVENIT DE LA FIBROBLASTELE DERMALE PRIMARE UMANE CULTIVATE ÎN SISTEM 2D ŞI 3D PRIVIND ACȚIUNEA ACESTUIA ASUPRA PROCESELOR IMPLICATE ÎN VINDECAREA RĂNILOR CUTANATE 197

II.5.1. Introducere şi obiective 197

II.5.2. Materiale şi metode 198

II.5.2.1. Linia murină C57BL/6 198

II.5.2.2. Producerea, colectarea şi păstrarea secretomului 198

II.5.2.3. Tehnica implantării subcutanate a Matrigelului 198

II.5.2.4. Coloraţia Hematoxilină-Eozină 199

II.5.2.5. Coloraţia Tricromă Masson-Goldner 200

II.5.2.6. Imagistică de fluorescenţă 200

II.5.2.7. Modelul de rană excizională murină 201

II.5.2.8. Evaluarea închiderii rănii 202

II.5.2.9. Coloraţia Herovici 202

II.5.2.10. Analiza statistică 203

II.5.3. Rezultate 203

II.5.3.1. Evidențierea *in vivo* a proprietăților pro-angiogene ale secretomului recoltat de la sferoizi derivați din fibroblaste 203

II.5.3.2. Optimizarea modelului animal de rană cutanată, pregătirea grupelor experimentale și selectarea zilelor de analiză 205

II.5.3.3. Evidențierea efectului pro-reparator al secretomului provenit de la fibroblastele cultivate în sistem 3D prin cuantificarea închiderii rănii excizionale murine 207

II.5.3.4. Evidențierea efectului pro-reparator al secretomului provenit de la fibroblastele cultivate în sistem 3D asupra rănii excizionale prin evaluare histologică și imunohistochimică 210

II.5.4. Discuţii şi concluzii parţiale 217

CONCLUZII GENERALE 219

BIBLIOGRAFIE 220

INTRODUCERE ȘI OBIECTIVELE GENERALE

Vindecarea rănilor ţesutului cutanat este un proces fiziologic ce implică o succesiune de evenimente biologice și moleculare interconectate, ca răspuns la apariţia unei leziuni, rezultând reconstituirea integrităţii straturilor pielii şi restaurarea homeostaziei. În timpul acestui proces dinamic și complex, multiple căi biologice sunt activate și sincronizate, interacțiuni coordonate existând între celulele inflamatorii, fibroblastele (Fb) dermale, keratinocite și celulele endoteliale (Paul și Sharma, 2004; Reinke și Sorg, 2012). Totodată, celulele stem rezidente pot fi supuse auto-replicării şi diferențierii în mai multe tipuri celulare şi pot afecta implicit semnalizarea paracrină de la nivelul rănii, iar toate aceste atribute sunt cruciale pentru regenerarea tisulară (Chen și colab., 2009).

În funcție de durata procesului de vindecare, rănile cutanate sunt clasificate în acute și cronice (vindecabile și, respectiv, greu vindecabile) (Robson și colab., 2001). Rănile acute prezintă semne bine definite de recuperare în decurs de 4 până la 12 săptămâni, perioada de vindecare depinzând de amploarea leziunii. În unele cazuri, este imposibilă restabilirea în mod eficient a structurii și funcției normale a țesutului, procesul fiziologic de vindecare al rănilor fiind întrerupt, ca rezultat al disfuncționalităților în reglarea răspunsurilor de reparare tisulară, precum inflamația, angiogeneza, depunerea matricii extracelulare și recrutarea celulelor. Astfel, faza inflamatorie prelungită asociată cu o inflamație excesivă, scăderea angiogenezei, migrarea

și proliferarea slabă a keratinocitelor și Fb sunt elementele ce definesc rănile cronice (Falanga, 2005; Lazarus și colab., 1994).

În prezent, incidența rănilor cronice continuă să crească, reprezintând o provocare clinică semnificativă. De obicei, sunt afectați adulții cu comorbidități, precum ar fi insuficiența venoasă, diabetul, obezitatea, neuropatiile, insuficiența arterială sau cei care prezintă diverşi factori limitativi precum îmbătrânirea, infecțiile, alimentația deficitară, imunosupresia. Rănile cronice sunt clasificate în trei mari categorii: ulcere vasculare, ulcere diabetice și ulcere de presiune (Nunan și colab., 2014).

În ciuda eforturilor depuse de-a lungul timpului, rănile cutanate cronice și vindecarea acestora reprezintă provocări clinice majore, care implică o povară socială și medicală considerabilă. Există însă un interes semnificativ în utilizarea celulelor stem în gestionarea acestei probleme. În ultimele decenii medicina regenerativă a câştigat o atenție considerabilă, bazându-se pe refacerea, înlocuirea sau repararea celulelor, țesuturilor și organelor traumatizate, oferind astfel posibile metode de tratament.

Celulele stromale mezenchimale (MSC) joacă un rol important în acest domeniu. Acestea sunt definite drept un grup heterogen de celule progenitoare nespecializate fusiforme (formă asemănătoare cu cea a Fb), de origine mezodermică, aderente la plastic în condiţii de cultură standard şi capabile să se auto-reînnoiască prin diviziune și să se diferențieze în mai multe linii celulare (Wei și colab., 2013). Aceste celule au fost identificate pentru prima dată în măduva osoasă (BM), însă, recoltarea celulelor de la nivelul BM (aspirat provenit din BM) este o procedură invazivă şi dureroasă, cu randament scăzut de obţinere a MSC (Pittenger și colab., 1999).

Aceste limitări au condus la căutarea unor modalităţi alternative de obținere a celulelor stromale mezenchimale, precum ar fi recoltarea acestora de la nivelul ţesutului adipos sau din alte surse tisulare, ca de exemplu gelatina Wharton, sângele din cordonul ombilical, placenta, lichidul amniotic etc. (Keating, 2006; Ullah și colab., 2015; Gottipamula și colab., 2018; Eom și colab., 2011). Cu toate acestea, sunt preferate sursele care permit proceduri de recoltare minim invazive precum și izolarea unor cantități abundente de celule, cum ar fi ţesutul adipos (Kuhbier și colab., 2010).

Iniţial s-a studiat capacitatea de diferenţiere a MSC ca potenţială terapie regenerativă în vindecarea rănilor ţesutului cutanat. S-a demonstrat însă că transplantul de MSC la locul leziunii acționează în primul rând prin efecte paracrine indirecte, mai degrabă decât prin înlocuirea directă a celulelor afectate. Această acţiune paracrină este datorată secretomului constituit din factorii solubili (citokine, chemokine) şi veziculele extracelulare secretate de celule în spaţiul extracelular. Astfel, în prezent se încearcă abordarea unor noi metode terapeutice acelulare care vizează utilizarea secretomului MSC în vindecarea rănilor prin stimularea angiogenezei, modularea inflamației, reducerea formării cicatricilor și inducerea re-epitelizării (Zarei și Soleimaninejad, 2018; Guillamat-Prats, 2021; Ahangar și colab., 2020). În comparație cu utilizarea celulelor, această terapie acelulară este mai puțin imunogenă și prezintă un risc minim de formare a tumorilor (Vizoso și colab., 2017; Lu și colab., 2017; Ha și colab., 2020), oferind de asemenea şi avantaje în ceea ce privește manipularea și siguranța.

Celulele prezintă un număr limitat de multiplicări (dublări de populaţie) *in vitro,* instalându-se destul de repede senescenţa şi implicit moartea acestora. Astfel, pentru a depăși această limitare, se utilizează tehnici de reactivare a telomerazei (enzima ce contribuie la menţinerea lungimii telomerelor), celulele realizând un număr nelimitat de diviziuni sau metode de inactivare a proteinelor implicate în reglarea ciclului celular. Totodată, celulele obținute prin această metodă sunt similare sau identice din punct de vedere genetic și fenotipic cu celulele de origine. Această abordare poartă numele de ,,imortalizare celulară'' și a fost posibilă datorită cunoașterii bazelor moleculare care susțin acest fenomen *in vivo* în cazul cancerului (Ivanković și colab., 2007; Chalak și colab., 2024; de Bardet și colab., 2023).

Fb și MSC prezintă numeroase caracteristici comune: morfologia fusiformă, localizarea la nivelul țesutului conjunctiv, potenţialul proliferativ, expresia markerilor de suprafaţă specifici, multipotența, lipsa activităţii telomerazei, cât şi tiparele de expresie genică. Mai mult decât atât, acestea prezintă funcţii similare în reglarea imunității. Datorită acestor asemănări, Fb ar putea fi utilizate ca potențială alternativă a MSC pentru utilizarea în aplicații clinice care implică regenerarea țesuturilor, spre exemplu pentru tratamentul rănilor cutanate. Acestea pot fi recoltate cu ușurință în număr mare din diverse țesuturi biologice, cum ar fi pielea, țesutul adipos și gingival, în timp ce sursa cea mai frecvent utilizată de MSC, BM, oferă relativ puțin material de pornire pentru expansiunea celulară și necesită metode de recoltare invazive. În plus, timpul de dublare al populației este semnificativ mai scurt comparativ cu MSC, senescenţa Fb instalându-

se după mai mult de 50 dublări populaţionale (Huang și colab., 2010). Totodată, cerințele mediilor de cultură pentru expandarea și menținerea Fb în cultură nu sunt unele complexe.

Pe de altă parte, potențialul regenerativ al celulelor mezenchimale este influențat de diverși factori, cum ar fi țesutul de origine, vârsta donatorului, condițiile de cultură sau prezența factorilor inflamatori din organism (Ferreira și colab., 2018). Din acest motiv, mai multe strategii de precondiționare a MSC *in vitro*, precum ar fi cultivarea în condiţii hipoxice, în sistem 3D sau tratamentul cu factori inflamatori, au fost utilizate pentru a stimula proprietățile lor secretorii (Haider and Ashraf, 2010; Lu și colab., 2010). Mai mult decât atât, fibroblastelor cultivate sub formă de agregate le-a fost atribuit de către Vaheri și colab. conceptul de ,,nemoză'' (Vaheri și colab., 2009). Mai exact, această noţiune este definită ca o modalitate de activare a celulelor, care este caracterizată prin creșterea producției de COX-2 (ciclooxigenază-2), secreția de prostaglandine, proteinaze, citokine chemotactice, HGF (factorul de creștere al hepatocitelor), VEGF (factorul de creștere endotelial vascular) și exprimarea factorului nuclear activat-kappa B (Vaheri și colab., 2009; Enzerink și colab., 2010). Astfel, prin acest proces pot fi îmbunătăţite proprietăţile paracrine ale Fb, ce pot sta la baza strategiilor terapeutice care utilizează secretomul (terapii ,,fără celule'').

De asemenea, generarea de MSC din celule stem pare să ofere oportunitatea unică de a depăşi majoritatea obstacolelor care există în prezent în ceea ce priveşte utilizarea pe scară largă a MSC ca terapie inovatoare. De-a lungul timpului, s-a raportat faptul că celulele stem pluripotente induse (iPSC) pot fi diferenţiate în MSC, precum şi în Fb. Acestea provin dintr-o singură clonă de iPSC, prezentând omogenitate ridicată pentru aplicații clinice. Mai mult decât atât, performanța lor biologică este mai stabilă și mai previzibilă, întrucât tiparul molecular al MSC native se schimbă subtil între diferite loturi.

Astfel, **scopul** acestei tezei de doctorat a fost de a evalua efectele secretomului provenit de la celulele mezenchimale umane asupra procesului de vindecare a rănilor, atât *in vitro*, cât şi *in vivo* pe un model murin de rană. Pentru îndeplinirea acestui scop au fost propuse mai multe **obiective** utilizându-se surse celulare multiple, toate de origine umană.

Obiectiv 1. Obţinerea şi caracterizarea celulelor stromale mezenchimale (MSC) umane derivate din măduva osoasă și din țesutul adipos, precum și a fibroblastelor dermale umane primare sau obţinute din celule stem pluripotente induse umane.

Obiectiv 2. Testarea *in vitro* a secretomului provenit de la o linie imortalizată de MSC derivate din ţesut adipos (ADSC) urmărind efectul asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate.

Obiectiv 3. Studiu comparativ privind proprietăţile fibroblastelor dermale umane şi a MSC umane derivate din măduva osoasă cultivate în sistem bi- (2D) şi tridimensional (3D).

Obiectiv 4. Testarea *in vitro* a efectului secretomului provenit de la fibroblastele dermale primare şi de la fibroblastele derivate din celulele stem pluripotente induse umane cultivate în sistem 2D şi 3D asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate.

Obiectiv 5. Testarea *in vivo* a secretomului provenit de la fibroblastele dermale primare umane cultivate în sistem 2D şi 3D privind acţiunea acestuia asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate.

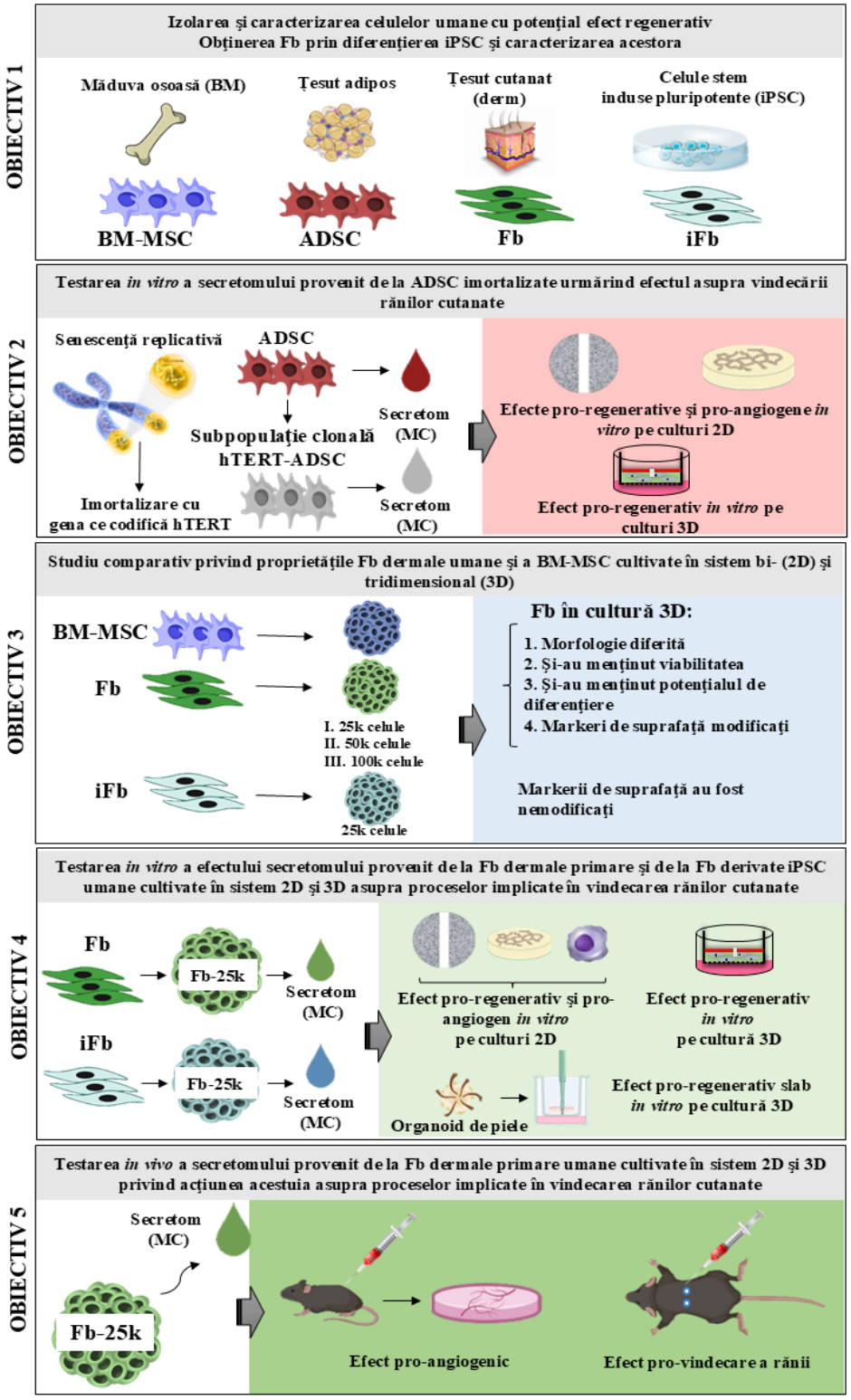
STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza este structurată în **9 capitole**, cuprinzând atât noţiuni teoretice privind stadiul actual al cunoştinţelor, cât şi rezultatele originale obţinute (partea de contribuţii originale).

Prima parte („Stadiul actual al cunoașterii") este structurată în ***4 capitole*** şi cuprinde date din literatură aduse la zi cu privire la subiectul vizat de această teză. Mai exact, în **capitolul I.1** este prezentată problematica rănilor cutanate, fiind vizate fundamentele anatomice şi fiziologice ale ţesutului cutanat, etapele vindecării rănilor alături de prezentarea succintă a perturbării procesului fiziologic întâlnit în cazul rănilor cronice, dar și abordările terapeutice actuale. **Capitolul I.2** vizează caracteristicile definitorii ale contribuţiei secretomului provenit de la MSC în procesul de vindecare al rănilor cutanate, punându-se accent pe caracterizarea MSC, descrierea compoziţiei secretomului provenit de la acestea, dar şi prezentarea metodelor actuale de potenţare a efectelor. De asemenea, sunt expuse studiile din literatură ce presupun utilizarea secretomului provenit de la celulele stromale mezenchimale drept potenţială terapie pentru rănile cutanate. **Capitolul I.3** se concentrează pe conceptul de utilizare a Fb ca alternativă a MSC, fiind prezentate similitudinile dintre acestea, dar şi studiile existente privind

aplicabilitatea secretomului provenit de la Fb drept posibilă terapie pentru rănile cutanate. În **Capitolul I.4** sunt prezentate potenţiale direcţii pentru obţinerea unei surse inepuizabile de celule mezenchimale: imortalizarea celulară, precum şi generarea acestora din iPSC. Unele date cuprinse în această parte fac parte dintr-un articol de tip *review* publicat anul acesta într-un jurnal indexat ISI: **Gheţu, D-.M.**, Raymond, K., Titorencu, I., Simionescu, M. **2025.** Innovative Strategies: Use of Stromal Cell-Derived Secretome for Chronic Wound Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(12), p.5609. 10.3390/ijms26125609 (IF/2024 = 4.9, Q1, AIS = 1.121).

A doua parte („Contribuţii originale”) este structurată în ***5 capitole*** care au avut la bază cele 5 obiective enunţate anterior. Astfel, pentru îndeplinirea obiectivelor propuse au fost utilizate tehnici precum cele de culturi celulare, citometrie în flux, biologie moleculară, histologie, precum şi teste pe animale, toate acestea fiind descrise în secţiunile „Materiale şi Metode” aferente fiecărui studiu. Conţinutul capitolelor este schematizat în figura de mai jos şi prezentat succint în cele ce urmează.



Schematizarea conținutului celor 5 capitole (obiective) cuprinse în partea a doua a tezei („Contribuții originale”). MC: mediu condiționat; hTERT: subunitatea catalitică a telomerazei umane.

Capitolul II.1 al tezei este asociat cu primul obiectiv (Obiectiv 1), fiind intitulat „**Obţinerea şi caracterizarea celulelor stromale mezenchimale (MSC) umane derivate din măduva osoasă și din țesutul adipos, precum și a fibroblastelor dermale umane primare sau obţinute din celule stem pluripotente induse umane**”. Acesta prezintă obţinerea de celule primare cu potențial regenerativ pentru vindecarea rănilor (MSC derivate din BM şi ţesut adipos şi Fb izolate de la nivelul dermului) şi caracterizarea acestora din punct de vedere al markerilor specifici şi al capacităţii de diferenţiere către liniile celulare mezodermice: linia adipogenă, osteogenă şi condrogenă. Mai mult decât atât, acesta este axat şi pe obţinerea Fb prin diferenţierea din iPSC şi caracterizarea acestora din punct de vedere al markerilor de suprafaţă şi intracelulari specifici (precum vimentina şi colagenul). Descrierea amănunțită a protocoalelor poate fi regăsită în secțiunea „Materiale și metode” aferentă acestui capitol. Rezultatele arată succesul izolării de celule primare care exprimă markerii specifici şi deţin capacitatea de diferenţiere către liniile celulare mezodermice. De asemenea, au fost obţinute Fb prin diferenţierea iPSC (iFb), exprimând markerii de suprafaţă şi intracelulari specifici. Aceste celule au fost folosite în experimentele *in vitro* şi *in vivo* pentru îndeplinirea celorlalte obiective propuse, care au ca scop utilizarea secretomului (mediului condiţionat) drept terapie „acelulară” pentru rănile cutanate.

Capitolul II.2 (Obiectiv 2) este intitulat „**Testarea *in vitro* a secretomului provenit de la o linie imortalizată de MSC derivate din ţesut adipos (ADSC) urmărind efectul asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate**”. În cadrul acestuia este prezentată generarea unei linii imortalizate de ADSC (subpopulaţie clonală) prin transducția lentivirală a genei care codifică transcriptaza inversă (componenta catalitică) a telomerazei umane (hTERT) pentru inhibarea fenomenului de senescenţă replicativă şi evaluarea *in vitro* a efectelor secretomului (mediului condiţionat) provenit de la aceste celule asupra proceselor cheie asociate vindecării rănilor cutanate. Pe scurt, s-a raportat impactul secretomului (mediului condiţionat) asupra proliferării și migrării keratinocitelor, Fb şi celulelor endoteliale, cât și asupra angiogenezei (procese care au loc în timpul fazei proliferative a vindecării rănilor). Totodată a fost demonstrat şi efectul de susținere a procesului de re-epitelizare a unei răni realizate pe un model de cultură organotipică de piele umană. Rezultatele expuse în acest capitol au fost cuprinse într-o lucrare publicată într-un jurnal indexat ISI: **Iacomi, D. M.**, Roşca A. M., Ţuţuianu, R., Neagu, T. P., Prună, V., Simionescu, M., Titorencu, I. **2022**. Generation of an

immortalized human adipose-derived mesenchymal stromal cell line suitable for wound healing therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16):8925. DOI: 10.3390/ijms23168925 (IF/2022 = 5.6, Q1, AIS = 1.028).

Capitolul II.3 (Obiectiv 3) intitulat „**Studiu comparativ privind proprietăţile fibroblastelor dermale umane şi a MSC umane derivate din măduva osoasă cultivate în sistem bi- (2D) şi tridimensional (3D)**" a implicat analiza comparativă a BM-MSC şi a Fb dermale primare umane (ca sursă celulară alternativă mult mai accesibilă)/diferenţiate din iPSC cultivate în sistem 3D (drept strategie de îmbunătăţire a capacităţii secretorii), mai exact în agregate celulare (sferoizi) obţinute prin cultivarea suspensiei celulare în picături suspendate („*hanging drops*"). Sferoizii/celulele primare din componenţa acestora au fost analizaţi/analizate din punct de vedere al morfologiei, viabilităţii, secreţiei componentelor matricei extracelulare, prezenţei moleculelor de adeziune, dar şi de menţinere al markerilor de suprafaţă specifici şi a potenţialului de diferenţiere către linia adipogenă, osteogenă şi condrogenă. Rezultatele au arătat că ambele tipuri celulare primare prezintă capacitatea de a agrega în sferoizi după 72 de ore, fiind detectată secreţia elementelor matricii extracelulare, menţinerea potenţialului de diferenţiere, însă şi unele modificări morfologice şi de prezenţă a markerilor de suprafaţă specifici. Din punct de vedere al viabilităţii nu s-au remarcat modificări semnificative în urma procesului de agregare. Fb diferenţiate din iPSC au format de asemenea sferoizi, menţinându-şi markerii de suprafaţă specifici în urma agregării. Datele originale cuprinse în acest studiu fac parte dintr-un articol în curs de redactare.

În **capitolul II.4** (Obiectiv 4) - „**Testarea *in vitro* a efectului secretomului provenit de la fibroblastele dermale primare şi de la fibroblastele derivate din celulele stem pluripotente induse umane cultivate în sistem 2D şi 3D asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate**" – sunt prezentate rezultatele obţinute *in vitro* privind evaluarea efectelor secretomului (mediului condiţionat) provenit de la Fb dermale primare cultivate în sistem 3D (sferoizi) asupra proceselor cheie asociate vindecării rănilor cutanate: inflamaţia, angiogeneza şi re-epitelizarea, comparativ cu efectele mediului condiţionat provenit de la Fb cultivate în monostrat (2D). S-a arătat creşterea secreţiei factorilor pro-angiogenici prin cultivarea tridimensională (3D) a Fb dermale umane primare sub formă de sferoizi (25000 celule/sferoid – 25k), îmbunătăţirea proceselor de migrare şi proliferare, cât şi de re-epitelizare la nivelul rănii pe un model 3D de cultură organotipică de piele în prezenţa mediului condiţionat

provenit de la aceste celule. Astfel, rezultatele obţinute confirmă faptul că secretomul provenit de la aceste celule cultivate în sistem 3D reprezintă astfel o posibilă strategie de tratament pentru vindecarea rănilor. Totodată, sunt prezentate şi rezultatele privind evaluarea secretomului obţinut de la Fb derivate din iPSC (iFb) cultivate atât în sistem 2D cât şi 3D (25000 celule/sferoid), însă nefiind evidenţiat un efect de potenţare a re-epitelizării pe un model 3D al unui echivalent de piele obţinut din organoizi. Datele originale cuprinse în acest studiu fac parte dintr-un articol în curs de redactare.

Ultimul capitol al părţii originale, **capitolul II.5** (Obiectiv 5) **-** „**Testarea *in vivo* a secretomului provenit de la fibroblastele dermale primare umane cultivate în sistem 2D şi 3D privind acţiunea acestuia asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate**" este asociat cu evaluarea *in vivo* a efectelor secretomului (mediului condiţionat) provenit de la Fb dermale primare cultivate în sistem 3D (sferoizi alcătuiţi din 25000 celule/25k) din punct de vedere al angiogenezei şi al procesului de re-epitelizare, comparativ cu efectele mediului condiţionat provenit de la Fb cultivate în monostrat. Pe scurt, rezultatele au arătat efectul benefic al secretomului provenit de la Fb dermale umane primare asupra angiogenezei şi a re-epitelizării rănilor cutanate, utilizându-se tehnica Matrigel *plug assay* şi un model de rană la şoareci. Datele originale cuprinse în acest studiu fac de asemenea parte dintr-un articol în curs de redactare.

Conţinutul tezei se încheie cu referințele bibliografice aferente.

CONTRIBUŢII PERSONALE

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ŞI COMUNICATE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL

Lucrări publicate în reviste indexate ISI – autor principal

1. **Gheţu, D.-M**, Raymond, K., Titorencu, I., Simionescu, M. **2025**. Innovative Strategies: Use of Stromal Cell-Derived Secretome for Chronic Wound Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(12). DOI: (IF/2024 = 4.9, Q1, AIS = 1.121).

2. Sorca†, B. V., Kaya, D. A., Kaya, M. G. A., Enăchescu, M., **Ghetu†, D.-M.**, Enache, L.-B., Boeraşu, I., Coman, A. E., Rusu, L. C., Constantinescu, R., Titorencu, I. **2025**. Bone Fillers

with Balance Between Biocompatibility and Antimicrobial Properties. *Biomimetics*, 10(2), 100. DOI: 10.3390/biomimetics10020100 (IF/2023 = 3.4, Q2, AIS = 0.567).

3. **Iacomi, D. M.**, Roşca A. M., Ţuţuianu, R., Neagu, T. P., Prună, V., Simionescu, M., Titorencu, I. **2022**. Generation of an immortalized human adipose-derived mesenchymal stromal cell line suitable for wound healing therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16):8925. DOI: 10.3390/ijms23168925 (IF/2022 = 5.6, Q1, AIS = 1.028).

Lucrări publicate în reviste indexate ISI – co-autor

1. Ţuţuianu, R., Roşca, A. M., **Iacomi, D. M.**, Simionescu, M., Titorencu, I. **2021**. Human mesenchymal stromal cell-derived exosomes promote *in vitro* wound healing by modulating the biological properties of skin keratinocytes and fibroblasts and stimulating angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6239. DOI: 10.3390/ijms22126239 (IF/2021 = 5.924, Q1, AIS = 1.064).

Colaborator la un capitol într-o monografie publicată în străinătate

1. Roșca, A.M., Ţuţuianu, R., **Ghetu, D.M.**, Titorencu, I., **2023.** Mesenchymal stromal cells for wound healing therapy: From expectations to reality. In: K.H. Haider, ed. *Handbook of Stem Cell Applications*. Singapore: Springer. DOI: 10.1007/978-981-99-0846-2_53-1.

Lucrări în curs de redactare

1. **Gheţu, D.-M.**, Ţuţuianu, R., Titorencu, I., Roşca, A.M. The secretome of human dermal fibroblasts spheroids supports skin regeneration by promoting the remodeling of the extracellular matrix on a full thickness wound mouse model.

2. **Gheţu D.-M.,** Ramovs V., Flesseman M., Titorencu I., Raymond K., A Novel FullThickness In Vitro Human Wound Model Based on Organoid-derived Skin Equivalent.

Comunicări susținute la manifestări ştiinţifice internaţionale şi naţionale - autor principal

Prezentări orale (2):

1. **Gheţu D.M.,** Roşca A.M., Ţuţuianu R., Neagu T.P., Prună V., Simionescu M., Titorencu I. Aggregates of dermal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells exhibit different characteristics: implications for regenerative therapy, „*International Conference and XXXIX Scientific Session of the Romanian Society of Cell Biology*”, 21-23 octombrie 2022, Cluj, România.

2. **Iacomi D.M.**, Roşca A.M., Ţuţuianu R., Prună V., Titorencu I., Simionescu M. Generation and characterization of an immortalized human adipose mesenchymal stromal cell line, *International Conference under the aegis of the Romanian Academy 42nd Anniversary Symposium of the Institute of Cellular Biology and Pathology ,,Nicolae Simionescu" held jointly with 38th annual scientific session of The Romanian Society for Cell Biology*, 4-6 noiembrie 2021, conferinţă online.

Postere (3):

1. **Gheţu D. M.**, Ţuţuianu R., Albu Kaya M. G., Roşca A. M., Titorencu I. Development of three-dimensional intestinal organotypic models using various collagen-based dermal equivalents", poster prezentat la conferinţa internaţională „*Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering (NanoBioMat)*", 25-27 iunie, 2025 (ediţia de vară), participare online.
2. **Gheţu D.M.**, Ţuţuianu R., Roşca A.M., Simionescu M., Titorencu I., Three-dimensional aggregation stimulates the pro-angiogenic properties of adult human dermal fibroblasts, poster prezentat la simpozionul aniversar cu participare internaţională *,,Aspiraţie, inspiraţie şi inovaţie în explorarea de noi frontiere în cercetarea biomedicală"* – organizat cu ocazia a 45 de ani de existenţă a Institutului de Biologie şi Patologie Celulară ,,Nicolae Simionescu", 17-18 decembrie 2024, Bucureşti, România.
3. **Gheţu D.M.**, Roşca A.M., Ţuţuianu, R., Prună, V., Simionescu, M., Titorencu, I., Human dermal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells display different characteristics when cultured in 3D settings, poster prezentat la simpozionul ştiinţific anual al Institutului de Biologie şi Patologie Celulară ,,Nicolae Simionescu" cu participare internaţională *,,43 years on the never-ending road of cardiovascular discoveries"*, 8-9 decembrie 2022, Bucureşti, România.

Postere susținute la manifestări ştiinţifice naţionale şi internaţionale (co-autor)

1. Ţuţuianu R., **Gheţu D.M.**, Titorencu I., Roşca A.M.. Mediul condiţionat derivat de la fibroblaste cultivate în sferoizi promovează regenerarea pielii pe un model murin de rană cutanată, poster prezentat la manifestaţia ştiinţifică: Simpozionul ARSAL 2024 *,,Evaluarea severității și conceptul 3R în proiectele ce folosesc animale în experimentare"*, organizat de Asociaţia Română pentru Ştiinţa Animalelor de Laborator, găzduită de Institutul Național de

Cercetare-Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș", 29 martie 2024, Bucureşti, România.

2. Prună V., **Gheţu D.M.**, Vrânceanu D., Cotruţ C., Vlădescu (Dragomir) A., Titorencu I., Enhanced osteogenic differentiation of human adult mesenchymal stem cells cultured on plate-like hydroxyapatite coatings, conferinţa ştiinţifică internaţională *„Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering (NanoBioMat)"*, 28-30 iunie 2023 (Ediţia de vară) – participare online.

3. Ţuţuianu R., Roşca A.M., **Gheţu D.M.**, Prună V., Albu Kaya M. Evaluation of mesenchymal cells-derived products as therapeutics for skin regeneration, poster prezentat la manifestaţia ştiintifică *„1st NETSKINMODELS Network event"* organizată la Bratislava, Slovacia, 14-18 februarie 2023.

4. Rădulescu A. L., **Iacomi D.M.**, Florea G., Roşca A. M., Tutuianu R., Titorencu I. Obţinerea şi caracterizarea celulelor stem mezenchimale derivate din ţesut adipos, *Conferința dedicată Zilei Internaționale a Microorganismelor (ZIM)*, 17 septembrie 2021, Bucureşti, România.

Brevete naționale înregistrate

1. Aplicaţie OSIM nr. A/00370 (25.06.2021): „Hidrogeluri polimerice compozite cu proprietăţi antibacteriene şi cicatrizante şi procedeu de obţinere a acestora"; Autori: Simionescu M., Roşca A.M., Titorencu I.D., **Iacomi M.D.**, Ţuţuianu R., Prună V., Lasca I., Chercheriţă I.A., Neagu P.T., Mogoantă L., Mogoşanu G.D., Pirici N.D., Streba C.T., Birca A.C., Burduşel A.C., Stoica A.E., Grumezescu A.L., Chircov C.

CURSURI ŞI SEMINARII EFECTUATE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL

1. Training School (Școala de formare) "3D Skin Cultures" organizată în cadrul acțiunii COST CA21108 – Rețeaua Europeană pentru Ingineria și Modelarea Pielii (NETSKINMODELS) – 29 iunie-2 iulie 2025, Nijmegen, Țările de Jos.

2. Prof. Dimitris Kardassis: Lectures to the students (Lipoprotein pathways and their roles in the pathophysiology of atherosclerosis; Transcriptional Regulation of Cardiovascular Genes: Basic principles and methodologies *in vitro* and *in vivo*; Hormone Nuclear receptors: from basic

biology to clinical exploitation in cardiovascular disease), 14-18 noiembrie 2024, Institutul de Biologie şi Patologie Celulară ,,Nicolae Simionescu'', Bucureşti, România.

3. Curs de formare realizat la Universitatea de Medicină şi Farmacie ,,Carol Davila'' din Bucureşti intitulat ,,*Ştiinţa animalelor de laborator"* în perioada 30.01-10.02.2023.

4. INTERA-1 Summer School ,,*Encapsulation of cells and drugs: materials, procedures and applications"*, 13-14 mai 2021, Institutul de Biologie şi Patologie Celulară ,,Nicolae Simionescu'', Bucureşti, România.

5. INTERA Online Workshop ,,*Recent advances in the field of obtaining nanovectors for gene transfection*'', 22 aprilie 2021, Institutul de Biologie şi Patologie Celulară ,,Nicolae Simionescu'', Bucureşti, România.

6. THERAVALDIS Online Workshop ,,*Diabetes in cardiovascular diseases; pathogenic mechanisms and targeted therapies*'', 27 noiembrie 2020, Institutul de Biologie şi Patologie Celulară ,,Nicolae Simionescu'', Bucureşti, România.

7. DIABETER Online Workshop *,,A new therapeutic tool in autoimmune diabetes: Mesenchymal Stromal Cell"*, 20 noiembrie 2020, Institutul de Biologie şi Patologie Celulară ,,Nicolae Simionescu'', Bucureşti, România.

STAGII INTERNAŢIONALE

1. Stagiu internaţional cu o durată de 9 luni (1.09.2023-31.05.2024) realizat la Centrul Medical al Universităţii din Leiden, Ţările de Jos, beneficiind de o bursă acordată de Ministerul Educației din România (conform HG 118/2023).

PREMII

1. Premiul oferit de Ministerul Educației și Cercetării și UEFISCDI ,,Realizări științifice – Articol original '', PN IV, Program 5.2 - Resurse umane – Subprogram 5.2.3 – Suport – Lista 1 – Primele aplicaţii trimise pentru articolele din 2021 şi 2022_13.03.2023 pentru articolul ,,Generation of an immortalized human adipose-derived mesenchymal stromal cell line suitable for wound healing therapy'' publicat în revista ,,International Journal of Molecular Sciences'', Volumul 23 (16), 8925, având factorul de impact în 2022 = 5.6 (**Iacomi, D. M.**, Roşca, A. M., Ţuţuianu, R., Neagu, T. P., Prună, V., Simionescu, M., Titorencu, I.).

2. Premiul oferit de Ministerul Educației și Cercetării și UEFISCDI „Realizări științifice – Articol original ”, Subprogramul 1.1 - Resurse umane - Acordarea rezultatelor cercetării - Articole, Concurență 2021, Rezultatele evaluării_Lista 2 - Cereri de premiere depuse pentru articolele publicate în 2021_18.11.2021 - pentru articolul „Human mesenchymal stromal cell-derived exosomes promote in vitro wound healing by modulating the biological properties of skin keratinocytes and fibroblasts and stimulating angiogenesis” publicat în revista „International Journal of Molecular Sciences”, Volumul 22(12), 6239, 2021, având factorul de impact în 2021 = 5.924 (Ţuţuianu, R., Roşca, A. M., **Iacomi, D. M.**, Simionescu, M., Titorencu, I.).

BURSE OBȚINUTE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL ȘI FINANŢAREA CERCETĂRILOR

BURSE

1. Bursă acordată de către Ministerul Educaţiei pentru realizarea unui stagiu de cercetare în străinătate (conform HG 118/2023) la Centrul Medical al Universităţii din Leiden, Ţările de Jos cu durată de 9 luni (1.09.2023-31.05.2024).
2. Bursă de doctorat - Şcoala de Studii Avansate a Academiei Române (2020-2023).

COLABORĂRI ÎN PROIECTE DE CERCETARE

Colaborator în granturi naționale:

1. **PN-IV-P7-7.1-PED-2024-1446**

Proiect experimental demonstrativ

Titlul proiectului**:** Substituenţi inovativi cu structură tridimensională şi activitate antimicrobiană pe bază de colagen pentru reconstrucţia cranio-facială (*Innovative antimicrobial collagen based three dimensional scaffolds for craniofacial reconstruction*)

Perioada: 2025-2027

Coordonator: Institutul de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, Bucureşti

Director de proiect: Dr. Irina Titorencu

Partener: LMS PLASTIC SURGERY CLINIQUE SRL – Dr. Ana Căruntu

2. **PN-III-P1-1.1-TE-2021-1344**

Proiect de cercetare pentru stimularea constituirii de tinere echipe de cercetare independente

Titlul proiectului: Îmbunătățirea proprietăților paracrine ale fibroblastelor prin agregare tridimensională pentru terapia rănilor cronice *(Enhancing the paracrine properties of fibroblasts by three-dimensional aggregation for chronic wounds therapy)* - FIBROTHER

Perioada: 2022-2024

Director de proiect: Dr. Roşca Ana-Maria

3. **PN-III-P2-2.1-PED-2021-4275**

Proiect experimental demonstrativ

Titlul proiectului: Optimizarea interacţiunii celulelor stem mezenchimale umane cu structuri biomimetice inovative cu aplicabilitate în ingineria tisulară *(Optimization of human mesenchymal stem cells interaction with innovative biomimetic structures for tissue engineering applications)* - BioMimCells

Perioada: 2022-2024

Coordonator: Universitatea Politehnica Bucureşti

Director de proiect: Dr. ing. Diana Maria Vrânceanu

Parteneri:

Institutul de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, Bucureşti - Responsabil partener: Dr. Irina Titorencu

Institutul National de Cercetare şi Dezvoltare în Optoelectronică (INOE 2000) - Responsabil partener: Dr. Alina Vlădescu

4. **PN III PCCDI 45/2018**

Proiecte complexe realizate în consorţii Cercetare Dezvoltare Inovare

Titlul proiectului: Nanostructuri bioactive pentru strategii terapeutice inovatoare (*Bioactive Nanostructures for Innovative Therapeutic Strategies*) - NANOLIFE

Perioada: 2018-2020

Coordonator: Universitatea de Medinică şi Farmacie din Craiova

Director de proiect: Dr. Laurenţiu Mogoantă

Parteneri:

Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București – Responsabil partener: Dr. Ioan Lascăr

Institutului de Biologie şi Patologie Celulară ,,Nicolae Simionescu'', Bucureşti – Responsabil partener: Dr. Irina Titorencu

Universitatea Politehnica Bucureşti - Responsabil partener: Dr. Alexandru Grumezescu

Colaborator în granturi internaționale:

1. **PNRR–III-C9-2022-I8 CF 197/15.11.2022**

Planul Național de Recuperare și Reziliență al României (*Romania's National Recovery and Resilience Plan*) - Proiect finanţat de către Uniunea Europeană

Titlul proiectului: Îmbunătăţirea potențialului endogen anti-oxidant și de îndepărtare a colesterolului prin editare genică în boala ficatului gras; studii preclinice *(Enchancing the endogenous anti-oxidant and cholesterol removal potential by gene editing in fatty liver disease; pre-clinical studies)* - THERAGENLIV

Perioada: 2023-2026

Director de proiect: Prof. Shlomo Sasson

2. ***European Cooperation in Science and Technology***

***CA21108 - European Network for Skin Engineering and Modeling* (NETSKINMODELS)**

Perioada: 2022-2026

Director de proiect: Prof. Sandrine Dubrac

REFERINŢE

1. Ahangar, P., Mills, S.J. and Cowin, A.J., 2020. Mesenchymal stem cell secretome as an emerging cell-free alternative for improving wound repair. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(19), pp.7038.
2. Chalak, M., Hesaraki, M., Mirbahari, S.N., Yeganeh, M., Abdi, S., Rajabi, S. and Hemmatzadeh, F., 2024. Cell immortality: in vitro effective techniques to achieve and investigate its applications and challenges. *Life*, *14*(3), pp.417.
3. Chen, M., Przyborowski, M. and Berthiaume, F., 2009. Stem cells for skin tissue engineering and wound healing. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, *37*(4-5), pp.399-421.
4. de Bardet, J.C., Cardentey, C.R., González, B.L., Patrone, D., Mulet, I.L., Siniscalco, D. and Robinson-Agramonte, M.D.L.A., 2023. Cell immortalization: in vivo molecular bases and in vitro techniques for obtention. *BioTech*, *12*(1), pp.14.
5. Enzerink, A., Rantanen, V. & Vaheri, A. 2010. Fibroblast nemosis induces angiogenic responses of endothelial cells. *Exp Cell Res,* 316**,** pp.826-35.

6. Eom, Y.W., Lee, J.E., Yang, M.S., Jang, I.K., Kim, H.E., Lee, D.H., Kim, Y.J., Park, W.J., Kong, J.H., Shim, K.Y. and Lee, J.I., 2011. Rapid isolation of adipose tissue-derived stem cells by the storage of lipoaspirates. *Yonsei Medical Journal*, *52*(6), pp.999-1007.
7. Falanga, V., 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet*, *366*(9498), pp.1736-1743.
8. Ferreira, J.R., Teixeira, G.Q., Santos, S.G., Barbosa, M.A., Almeida-Porada, G. and Gonçalves, R.M., 2018. Mesenchymal stromal cell secretome: influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Frontiers in Immunology*, *9*, pp.2837.
9. Guillamat-Prats, R., 2021. The role of MSC in wound healing, scarring and regeneration. *Cells*, *10*(7), pp.1729.
10. Ha, D.H., Kim, H.K., Lee, J., Kwon, H.H., Park, G.H., Yang, S.H., Jung, J.Y., Choi, H., Lee, J.H., Sung, S. and Yi, Y.W., 2020. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration. *Cells*, *9*(5), pp.1157.
11. Haider, H.K. and Ashraf, M., 2010. Preconditioning and stem cell survival. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, *3*, pp.89-102.
12. Huang, H.I., Chen, S.K., Ling, Q.D., Chien, C.C., Liu, H.T. and Chan, S.H., 2010. Multilineage differentiation potential of fibroblast-like stromal cells derived from human skin. *Tissue Engineering Part A*, *16*(5), pp.1491-1501.
13. Ivanković, M., Ćukušić, A., Gotić, I., Škrobot, N., Matijašić, M., Polančec, D. and Rubelj, I., 2007. Telomerase activity in HeLa cervical carcinoma cell line proliferation. *Biogerontology*, *8*, pp.163-172.
14. Keating, A., 2006. Mesenchymal stromal cells. *Current Opinion in Hematology*, *13*(6), pp.419-425.
15. Kuhbier, J.W., Weyand, B., Radtke, C., Vogt, P.M., Kasper, C. and Reimers, K., 2010. Isolation, characterization, differentiation, and application of adipose-derived stem cells. *Bioreactor systems for tissue engineering II: strategies for the expansion and directed differentiation of stem cells*, pp.55-105.
16. Lazarus, G.S., Cooper, D.M., Knighton, D.R., Margolis, D.J., Percoraro, R.E., Rodeheaver, G. and Robson, M.C., 1994. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound Repair and Regeneration*, *2*(3), pp.165-170.
17. Lu, G., Haider, H., Porollo, A. & Ashraf, M. 2010. Mitochondria-specific transgenic overexpression of connexin-43 simulates preconditioning-induced cytoprotection of stem cells. *Cardiovasc Res,* 88**,** pp.277-86.

18. Lu, K., Li, H.Y., Yang, K., Wu, J.L., Cai, X.W., Zhou, Y. and Li, C.Q., 2017. Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy for intervertebral disc degeneration: in-vitro study on exosomes in interaction of nucleus pulposus cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, *8*, pp.1-11.
19. Nunan, R., Harding, K.G. and Martin, P., 2014. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Disease Models & Mechanisms*, *7*(11), pp.1205-1213.
20. Paul, W. and Sharma, C.P., 2004. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends Biomater Artif Organs*, *18*(1), pp.18-23.
21. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. and Marshak, D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, *284*(5411), pp.143-147.
22. Reinke, J.M. and Sorg, H., 2012. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, *49*(1), pp.35-43.
23. Robson, M.C., Steed, D.L. and Franz, M.G. 2001. Wound healing; biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Problems Surg*, *38*, pp.61-140.
24. Gottipamula, S., Bhat, S. and Seetharam, R.N., 2018. Mesenchymal Stromal Cells: Basics, Classification, and Clinical Applications. *Journal of Stem Cells*, *13*(1).
25. Ullah, I., Subbarao, R.B. and Rho, G.J., 2015. Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, *35*(2), pp.e00191.
26. Vaheri, A., Enzerink, A., Räsänen, K. and Salmenperä, P., 2009. Nemosis, a novel way of fibroblast activation, in inflammation and cancer. *Experimental Cell Research*, *315*(10), pp.1633-1638.
27. Vizoso, F.J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J. and Perez-Fernandez, R., 2017. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(9), pp.1852.
28. Wei, X., Yang, X., Han, Z.P., Qu, F.F., Shao, L. and Shi, Y.F., 2013. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, *34*(6), pp.747-754.
29. Zarei, F. and Soleimaninejad, M., 2018. Role of growth factors and biomaterials in wound healing. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, *46*(sup1), pp.906-911.

ACADEMIA ROMÂNĂ

Școala de Studii Avansate a Academiei Române

Institutul de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

IDENTIFICAREA ŞI UTILIZAREA FACTORILOR SECRETAŢI DE CELULE CU ORIGINE MEZENCHIMALĂ ÎN TERAPIA RĂNILOR CUTANATE: STUDII *IN VITRO* ŞI *IN VIVO*

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

Acad. Maya Simionescu

DOCTORAND:

Daniela-Mădălina Iacomi (Gheţu)

Bucureşti

2025

Cuvinte-cheie: răni cutanate cronice, medicină regenerativă, celule stromale mezenchimale, imortalizare, fibroblaste, secretom, cultura tridimensională, vindecarea rănilor, re-epitelizare, angiogeneză

Număr total de pagini – 249

Număr de figuri în Partea I – 15

Număr de tabele în Partea I – 5

Număr de figuri în Partea a II-a – 99

Număr de tabele în Partea a II-a – 3

Număr de referințe bibliografice – 338

Lucrări publicate în jurnale internaționale indexate ISI în perioada stagiului de doctorat – 4 (3 în calitate de autor principal, una în calitate de co-autor)

Număr de lucrări în pregătire – 2 (autor principal)

Capitole de carte – 1

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – 2

Postere prezentate la manifestări științifice naţionale şi internaționale – 7 (3 în calitate de autor principal)

Stagii internaționale efectuate în timpul programului doctoral – 1

Participări la cursuri şi seminarii în perioada stagiului de doctorat – 7

Premierea de către UEFISCDI a rezultatelor cercetării: 2

Brevete naționale înregistrate – 1 (depus)

Burse obținute în cadrul programului de formare doctorală și finanțarea activității de cercetare – 2 (bursă doctorală de la Academia Română, bursă de la Ministerul Educației pentru un stagiu internațional de cercetare)

Participarea la granturi de cercetare naționale – 4

Participarea la granturi de cercetare internaționale – 2

CUPRINS

LISTĂ DE ABREVIERI 9

INTRODUCERE ŞI OBIECTIVELE GENERALE ALE TEZEI 14

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAŞTERII 18

I.1. RĂNILE CUTANATE: FUNDAMENTE ANATOMICE, FIZIOLOGICE ŞI ABORDĂRI TERAPEUTICE ACTUALE 19

I.1.1. Structura şi fiziologia pielii 19

I.1.1.1. Epidermă 20

I.1.1.2. Derm 24

I.1.1.3. Hipoderm 27

I.1.1.4. Structurile anexe ale pielii 27

I.1.2. Etapele vindecării rănilor cutanate 29

I.1.2.1. Hemostaza 30

I.1.2.2. Inflamaţia 32

I.1.2.3. Proliferarea 33

I.1.2.4. Remodelarea 34

I.1.3. Perturbarea procesului fiziologic de vindecare în cazul rănilor cronice cutanate 34

I.1.4. Abordări terapeutice actuale ale rănilor cronice cutanate 37

I.2. CONTRIBUŢIA SECRETOMULUI PROVENIT DE LA CELULELE STROMALE MEZENCHIMALE (MSC) ÎN PROCESUL DE VINDECARE AL RĂNILOR CUTANATE 41

I.2.1. Caracteristicile MSC 41

I.2.2. Compoziţia secretomului provenit de la MSC 43

I.2.2.1. Factori solubili 44

I.2.2.2. Vezicule extracelulare 46

I.2.3. Metode de îmbunătăţire a activităţii secretomului 48

I.2.3.1. Cultura celulelor în condiţii hipoxice 49

I.2.3.2. Cultura tridimensională (3D) a celulelor 51

I.2.3.3. Tratamentul celulelor cu diverse molecule inflamatorii 54

I.2.4. Secretomul provenit de la MSC – o potenţială terapie pentru rănile cutanate 55

I.3. UTILIZAREA FIBROBLASTELOR CA ALTERNATIVĂ A MSC 59

I.3.1. Similitudinea dintre fibroblaste şi MSC 59

I.3.2. Utilizarea secretomului provenit de la fibroblaste în terapia rănilor cutanate.. 60

I.3.2.1. Studii *in vitro* 60

I.3.2.2. Studii *in vivo* 67

I.4. METODE PENTRU OBŢINEREA UNEI SURSE INEPUIZABILE DE CELULE MEZENCHIMALE 69

I.4.1. Imortalizarea celulelor mezenchimale 69

I.4.2. Obţinerea celulelor mezenchimale din celule stem pluripotente induse..... 77

II. CONTRIBUŢII ORIGINALE 80

II.1. OBŢINEREA ŞI CARACTERIZAREA MSC UMANE DERIVATE DIN MĂDUVA OSOASĂ ŞI DIN ŢESUTUL ADIPOS, PRECUM ŞI A FIBROBLASTELOR DERMALE UMANE PRIMARE SAU OBŢINUTE DIN CELULE STEM PLURIPOTENTE INDUSE UMANE 81

II.1.1. Introducere şi obiective 81

II.1.2. Materiale şi metode 81

II.1.2.1. Izolarea MSC umane din măduva osoasă 81

II.1.2.2. Izolarea MSC umane din ţesutul adipos 82

II.1.2.3. Izolarea fibroblastelor dermale primare 83

II.1.2.4. Obţinerea fibroblastelor dermale prin diferenţierea celulelor stem pluripotente induse umane 84

II.1.2.5. Microscopia electronică de transmisie (TEM) 85

II.1.2.6. Analiza imunofenotipică prin tehnica de citometrie în flux 86

II.1.2.7. Imagistică de fluorescenţă 87

II.1.2.8. Analiza potenţialului de diferenţiere către linia adipogenă, osteogenă şi condrogenă 88

II.1.3. Rezultate 88

II.1.3.1. Obţinerea culturilor pure de MSC primare umane derivate din măduva osoasă şi din ţesutul adipos, precum şi de fibroblaste dermale umane primare 88

II.1.3.2. În cultură, MSC primare umane derivate din măduva osoasă şi din ţesutul adipos, precum şi fibroblastele dermale umane primare exprimă markerii celulari de suprafaţă specifici şi au potenţial de diferenţiere către linia adipogenică, osteogenă şi condrogenică 92

II.1.3.3. Caracterizarea fibroblastelor dermale obţinute prin diferenţierea celulelor stem pluripotente induse umane 94

II.1.4. Discuţii şi concluzii parţiale..... 98

II.2. TESTAREA *IN VITRO* A SECRETOMULUI PROVENIT DE LA O LINIE IMORTALIZATĂ DE MSC DERIVATE DIN ŢESUT ADIPOS (ADSC) URMĂRIND EFECTUL ASUPRA PROCESELOR IMPLICATE ÎN VINDECAREA RĂNILOR CUTANATE..... 99

II.2.1. Introducere şi obiective..... 99

II.2.2. Materiale şi metode..... 100

II.2.2.1. Culturi celulare..... 100

II.2.2.2. Design experimental pentru obţinerea subpopulaţiei clonale de ADSC101

II.2.2.3. Cinetica proliferării celulare..... 102

II.2.2.4. Teste de diferențiere multilinie..... 102

II.2.2.5. Cariotiparea subpopulaţiei clonale de celule imortalizate..... 103

II.2.2.6. Analiza expresiei proteice prin Western Blot..... 104

II.2.2.7. Producerea, colectarea şi păstrarea secretomului..... 104

II.2.2.8. Testarea viabilităţii celulare..... 104

II.2.2.9. Testarea proliferării celulare..... 105

II.2.2.10. Evaluarea migrării celulare prin metoda zgârierii monostratului celular („Scratch test”)..... 105

II.2.2.11. Evaluarea în timp real a chemotaxiei folosind sistemul xCELLigence... 105

II.2.2.12. Testul capacităţii de angiogeneză pe Matrigel..... 106

II.2.2.13. Detecția factorilor angiogeni utilizând kit-ul Angiogenesis Array... 106

II.2.2.14. Evaluarea re-epitelizării utilizând un model *in vitro* de cultură organotipică..... 106

II.2.2.15. Coloraţia Hematoxilină-Eozină..... 107

II.2.2.16. Analiza statistică..... 107

II.2.3. Rezultate..... 107

II.2.3.1. Caracterizarea subpopulaţiei clonale de ADSC imortalizate cu hTERT.. 107

II.2.3.2. Factorii eliberați în secretom (mediul condiționat) de către subpopulația clonală de ADSC transduse cu hTERT au o capacitate mare de a susține viabilitatea, proliferarea și migrarea keratinocitelor și a fibroblastelor dermale 110

II.2.3.3. Secretomul derivat de la subpopulația clonală de ADSC transdusă cu hTERT are proprietăți pro-angiogene.....114

II.2.3.4. Secretomul derivat de la subpopulația clonală de ADSC transdusă cu hTERT stimulează re-epitelizarea rănii realizate pe o cultură organotipică de piele 118

II.2.4. Discuții și concluzii parțiale 119

II.3. STUDIU COMPARATIV PRIVIND PROPRIETĂȚILE FIBROBLASTELOR DERMALE UMANE ŞI A MSC UMANE DERIVATE DIN MĂDUVA OSOASĂ CULTIVATE ÎN SISTEM BI- (2D) ŞI TRIDIMENSIONAL (3D) 123

II.3.1. Introducere şi obiective 123

II.3.2. Materiale şi metode 124

II.3.2.1. Celule utilizate în studiu 124

II.3.2.2. Model de cultură celulară 3D 124

II.3.2.3. Coloraţia Hematoxilină-Eozină 125

II.3.2.4. Detecţia prin imunofluorescenţă a F-actinei 125

II.3.2.5. Microscopia electronică de transmisie (TEM) 126

II.3.2.6. Coloraţia Anexină-PI 126

II.3.2.7. Analiza imunofenotipică prin tehnica de citometrie în flux 127

II.3.2.8. Analiza potențialului de diferențiere către linia adipogenă, osteogenă și condrogenă 128

II.3.2.9. Imagistică de fluorescenţă 128

II.3.2.10. Analiza expresiei proteice prin Western Blot 129

II.3.2.11. Analiza statistică 130

II.3.3. Rezultate 130

II.3.3.1. Caracterizarea comparativă a fibroblastelor dermale primare şi a MSC derivate din măduva osoasă cultivate în sistem 3D şi 2D din punct de vedere al morfologiei şi al menținerii proprietăților definitorii de MSC 130

II.3.3.2. Fibroblastele dermale primare și MSC derivate din măduva osoasă își mențin viabilitatea în culturi 3D 141

II.3.3.3. Evidențierea modificărilor de secreție a componentelor matricii extracelulare şi de exprimare a moleculelor de adeziune celulară prin cultivarea 3D a fibroblastelor dermale primare şi a MSC derivate din măduva osoasă...143

II.3.3.4. Menținerea markerilor de suprafață specifici în urma cultivării fibroblastelor dermale obținute prin diferențierea celulelor stem pluripotente induse în sistem 3D 151

II.3.4. Discuții și concluzii parțiale 153

II.4. TESTAREA *IN VITRO* A EFECTULUI SECRETOMULUI PROVENIT DE LA FIBROBLASTELE DERMALE PRIMARE ŞI DE LA FIBROBLASTELE DERIVATE

DIN CELULELE STEM PLURIPOTENTE INDUSE UMANE CULTIVATE ÎN SISTEM 2D ŞI 3D ASUPRA PROCESELOR IMPLICATE ÎN VINDECAREA RĂNILOR CUTANATE 158
II.4.1. Introducere şi obiective 158
II.4.2. Materiale şi metode 159
II.4.2.1. Celule utilizate în studiu 159
II.4.2.2. Producerea, colectarea şi păstrarea secretomului 159
II.4.2.3. Testarea proliferării celulare 161
II.4.2.4. Testarea proliferării celulare în timp real 161
II.4.2.5. Evaluarea migrării keratinocitelor şi a fibroblastelor prin intermediul metodei zgârierii monostratului („Scratch test") 162
II.4.2.6. Evaluarea în timp real a chemotaxiei folosind sistemul xCELLigence..... 162
II.4.2.7. Analiza expresiei genice prin tehnica qRT-PCR 162
II.4.2.8. Analiza Western Blot 164
II.4.2.9. Evaluarea migrării celulelor endoteliale microvasculare prin intermediul metodei zgârierii monostratului celular („Scratch test") 164
II.4.2.10. Formarea structurilor asemănătoare capilarelor în Matrigel..... 165
II.4.2.11. Detecţia factorilor angiogeni utilizând „Angiogenesis Array Kit" .. 165
II.4.2.12. Detecţia citokinelor cu ajutorul kit-urilor de tip array..... 166
II.4.2.13. Testul ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 166
II.4.2.14. Testarea viabilităţii celulare 167
II.4.2.15. Model de rană realizată pe un model de cultură organotipică de piele 167
II.4.2.16. Model de rană realizată pe un echivalent de piele obţinut din organoizi derivaţi din celule stem pluripotente induse umane 168
II.4.2.17. Coloraţia „Whole Mount" 169
II.4.2.18. Analiza statistică 170
II.4.3. Rezultate 170
II.4.3.1. Efectul secretomului asupra proliferării keratinocitelor și a fibroblastelor 170
II.4.3.2. Efectul secretomului asupra migrării keratinocitelor și a fibroblastelor.. 172
II.4.3.3. Efectul chemoatractiv a secretomului asupra keratinocitelor și a fibroblastelor 174

II.4.3.4. Evaluarea capacității fibroblastelor de a sintetiza componente ale matricii extracelulare 176

II.4.3.5. Efectul secretomului asupra migrării și chemoatracției celulelor endoteliale și a capacității de formare a structurilor asemănătoare capilarelor pe Matrigel 180

II.4.3.6. Identificarea și cuantificarea factorilor pro-angiogeni eliberați în cultura 2D, în comparație cu cultura 3D 183

II.4.3.7. Evaluarea funcțională *in vitro* a proprietăților anti-inflamatorii ale secretomului recoltat de la sferoizi derivați din fibroblaste 184

II.4.3.8. Efectul pro-reparativ al secretomului demonstrat pe un model de rană al unei culturi organotipice de piele 189

II.4.3.9. Testarea efectului secretomului provenit de la fibroblastele diferențiate din celule stem pluripotente induse umane asupra rănilor generate pe echivalenți de piele derivați din organoizi 191

II.4.4. Discuții şi concluzii parțiale 194

II.5. TESTAREA *IN VIVO* A SECRETOMULUI PROVENIT DE LA FIBROBLASTELE DERMALE PRIMARE UMANE CULTIVATE ÎN SISTEM 2D ŞI 3D PRIVIND ACȚIUNEA ACESTUIA ASUPRA PROCESELOR IMPLICATE ÎN VINDECAREA RĂNILOR CUTANATE 197

II.5.1. Introducere şi obiective 197

II.5.2. Materiale şi metode 198

II.5.2.1. Linia murină C57BL/6 198

II.5.2.2. Producerea, colectarea şi păstrarea secretomului 198

II.5.2.3. Tehnica implantării subcutanate a Matrigelului 198

II.5.2.4. Coloraţia Hematoxilină-Eozină 199

II.5.2.5. Coloraţia Tricromă Masson-Goldner 200

II.5.2.6. Imagistică de fluorescenţă 200

II.5.2.7. Modelul de rană excizională murină 201

II.5.2.8. Evaluarea închiderii rănii 202

II.5.2.9. Coloraţia Herovici 202

II.5.2.10. Analiza statistică 203

II.5.3. Rezultate 203

II.5.3.1. Evidențierea *in vivo* a proprietăților pro-angiogene ale secretomului recoltat de la sferoizi derivați din fibroblaste 203

II.5.3.2. Optimizarea modelului animal de rană cutanată, pregătirea grupelor experimentale și selectarea zilelor de analiză 205

II.5.3.3. Evidențierea efectului pro-reparator al secretomului provenit de la fibroblastele cultivate în sistem 3D prin cuantificarea închiderii rănii excizionale murine 207

II.5.3.4. Evidențierea efectului pro-reparator al secretomului provenit de la fibroblastele cultivate în sistem 3D asupra rănii excizionale prin evaluare histologică și imunohistochimică 210

II.5.4. Discuţii şi concluzii parţiale 217

CONCLUZII GENERALE 219

BIBLIOGRAFIE 220

INTRODUCERE ȘI OBIECTIVELE GENERALE

Vindecarea rănilor ţesutului cutanat este un proces fiziologic ce implică o succesiune de evenimente biologice și moleculare interconectate, ca răspuns la apariţia unei leziuni, rezultând reconstituirea integrităţii straturilor pielii şi restaurarea homeostaziei. În timpul acestui proces dinamic și complex, multiple căi biologice sunt activate și sincronizate, interacțiuni coordonate existând între celulele inflamatorii, fibroblastele (Fb) dermale, keratinocite și celulele endoteliale (Paul și Sharma, 2004; Reinke și Sorg, 2012). Totodată, celulele stem rezidente pot fi supuse auto-replicării şi diferențierii în mai multe tipuri celulare şi pot afecta implicit semnalizarea paracrină de la nivelul rănii, iar toate aceste atribute sunt cruciale pentru regenerarea tisulară (Chen și colab., 2009).

În funcție de durata procesului de vindecare, rănile cutanate sunt clasificate în acute și cronice (vindecabile și, respectiv, greu vindecabile) (Robson și colab., 2001). Rănile acute prezintă semne bine definite de recuperare în decurs de 4 până la 12 săptămâni, perioada de vindecare depinzând de amploarea leziunii. În unele cazuri, este imposibilă restabilirea în mod eficient a structurii și funcției normale a țesutului, procesul fiziologic de vindecare al rănilor fiind întrerupt, ca rezultat al disfuncționalităților în reglarea răspunsurilor de reparare tisulară, precum inflamația, angiogeneza, depunerea matricii extracelulare și recrutarea celulelor. Astfel, faza inflamatorie prelungită asociată cu o inflamație excesivă, scăderea angiogenezei, migrarea

și proliferarea slabă a keratinocitelor și Fb sunt elementele ce definesc rănile cronice (Falanga, 2005; Lazarus și colab., 1994).

În prezent, incidența rănilor cronice continuă să crească, reprezintând o provocare clinică semnificativă. De obicei, sunt afectați adulții cu comorbidități, precum ar fi insuficiența venoasă, diabetul, obezitatea, neuropatiile, insuficiența arterială sau cei care prezintă diverşi factori limitativi precum îmbătrânirea, infecțiile, alimentația deficitară, imunosupresia. Rănile cronice sunt clasificate în trei mari categorii: ulcere vasculare, ulcere diabetice și ulcere de presiune (Nunan și colab., 2014).

În ciuda eforturilor depuse de-a lungul timpului, rănile cutanate cronice și vindecarea acestora reprezintă provocări clinice majore, care implică o povară socială și medicală considerabilă. Există însă un interes semnificativ în utilizarea celulelor stem în gestionarea acestei probleme. În ultimele decenii medicina regenerativă a câştigat o atenție considerabilă, bazându-se pe refacerea, înlocuirea sau repararea celulelor, țesuturilor și organelor traumatizate, oferind astfel posibile metode de tratament.

Celulele stromale mezenchimale (MSC) joacă un rol important în acest domeniu. Acestea sunt definite drept un grup heterogen de celule progenitoare nespecializate fusiforme (formă asemănătoare cu cea a Fb), de origine mezodermică, aderente la plastic în condiţii de cultură standard şi capabile să se auto-reînnoiască prin diviziune și să se diferențieze în mai multe linii celulare (Wei și colab., 2013). Aceste celule au fost identificate pentru prima dată în măduva osoasă (BM), însă, recoltarea celulelor de la nivelul BM (aspirat provenit din BM) este o procedură invazivă şi dureroasă, cu randament scăzut de obţinere a MSC (Pittenger și colab., 1999).

Aceste limitări au condus la căutarea unor modalităţi alternative de obținere a celulelor stromale mezenchimale, precum ar fi recoltarea acestora de la nivelul ţesutului adipos sau din alte surse tisulare, ca de exemplu gelatina Wharton, sângele din cordonul ombilical, placenta, lichidul amniotic etc. (Keating, 2006; Ullah și colab., 2015; Gottipamula și colab., 2018; Eom și colab., 2011). Cu toate acestea, sunt preferate sursele care permit proceduri de recoltare minim invazive precum și izolarea unor cantități abundente de celule, cum ar fi ţesutul adipos (Kuhbier și colab., 2010).

Iniţial s-a studiat capacitatea de diferenţiere a MSC ca potenţială terapie regenerativă în vindecarea rănilor ţesutului cutanat. S-a demonstrat însă că transplantul de MSC la locul leziunii acționează în primul rând prin efecte paracrine indirecte, mai degrabă decât prin înlocuirea directă a celulelor afectate. Această acţiune paracrină este datorată secretomului constituit din factorii solubili (citokine, chemokine) şi veziculele extracelulare secretate de celule în spaţiul extracelular. Astfel, în prezent se încearcă abordarea unor noi metode terapeutice acelulare care vizează utilizarea secretomului MSC în vindecarea rănilor prin stimularea angiogenezei, modularea inflamației, reducerea formării cicatricilor și inducerea re-epitelizării (Zarei și Soleimaninejad, 2018; Guillamat-Prats, 2021; Ahangar și colab., 2020). În comparație cu utilizarea celulelor, această terapie acelulară este mai puțin imunogenă și prezintă un risc minim de formare a tumorilor (Vizoso și colab., 2017; Lu și colab., 2017; Ha și colab., 2020), oferind de asemenea şi avantaje în ceea ce privește manipularea și siguranța.

Celulele prezintă un număr limitat de multiplicări (dublări de populaţie) *in vitro,* instalându-se destul de repede senescenţa şi implicit moartea acestora. Astfel, pentru a depăși această limitare, se utilizează tehnici de reactivare a telomerazei (enzima ce contribuie la menţinerea lungimii telomerelor), celulele realizând un număr nelimitat de diviziuni sau metode de inactivare a proteinelor implicate în reglarea ciclului celular. Totodată, celulele obținute prin această metodă sunt similare sau identice din punct de vedere genetic și fenotipic cu celulele de origine. Această abordare poartă numele de ,,imortalizare celulară'' și a fost posibilă datorită cunoașterii bazelor moleculare care susțin acest fenomen *in vivo* în cazul cancerului (Ivanković și colab., 2007; Chalak și colab., 2024; de Bardet și colab., 2023).

Fb și MSC prezintă numeroase caracteristici comune: morfologia fusiformă, localizarea la nivelul țesutului conjunctiv, potenţialul proliferativ, expresia markerilor de suprafaţă specifici, multipotența, lipsa activităţii telomerazei, cât şi tiparele de expresie genică. Mai mult decât atât, acestea prezintă funcţii similare în reglarea imunității. Datorită acestor asemănări, Fb ar putea fi utilizate ca potențială alternativă a MSC pentru utilizarea în aplicații clinice care implică regenerarea țesuturilor, spre exemplu pentru tratamentul rănilor cutanate. Acestea pot fi recoltate cu ușurință în număr mare din diverse țesuturi biologice, cum ar fi pielea, țesutul adipos și gingival, în timp ce sursa cea mai frecvent utilizată de MSC, BM, oferă relativ puțin material de pornire pentru expansiunea celulară și necesită metode de recoltare invazive. În plus, timpul de dublare al populației este semnificativ mai scurt comparativ cu MSC, senescenţa Fb instalându-

se după mai mult de 50 dublări populaţionale (Huang și colab., 2010). Totodată, cerințele mediilor de cultură pentru expandarea și menținerea Fb în cultură nu sunt unele complexe.

Pe de altă parte, potențialul regenerativ al celulelor mezenchimale este influențat de diverși factori, cum ar fi țesutul de origine, vârsta donatorului, condițiile de cultură sau prezența factorilor inflamatori din organism (Ferreira și colab., 2018). Din acest motiv, mai multe strategii de precondiționare a MSC *in vitro*, precum ar fi cultivarea în condiţii hipoxice, în sistem 3D sau tratamentul cu factori inflamatori, au fost utilizate pentru a stimula proprietățile lor secretorii (Haider and Ashraf, 2010; Lu și colab., 2010). Mai mult decât atât, fibroblastelor cultivate sub formă de agregate le-a fost atribuit de către Vaheri și colab. conceptul de ,,nemoză'' (Vaheri și colab., 2009). Mai exact, această noţiune este definită ca o modalitate de activare a celulelor, care este caracterizată prin creșterea producției de COX-2 (ciclooxigenază-2), secreția de prostaglandine, proteinaze, citokine chemotactice, HGF (factorul de creștere al hepatocitelor), VEGF (factorul de creștere endotelial vascular) și exprimarea factorului nuclear activat-kappa B (Vaheri și colab., 2009; Enzerink și colab., 2010). Astfel, prin acest proces pot fi îmbunătăţite proprietăţile paracrine ale Fb, ce pot sta la baza strategiilor terapeutice care utilizează secretomul (terapii ,,fără celule'').

De asemenea, generarea de MSC din celule stem pare să ofere oportunitatea unică de a depăşi majoritatea obstacolelor care există în prezent în ceea ce priveşte utilizarea pe scară largă a MSC ca terapie inovatoare. De-a lungul timpului, s-a raportat faptul că celulele stem pluripotente induse (iPSC) pot fi diferenţiate în MSC, precum şi în Fb. Acestea provin dintr-o singură clonă de iPSC, prezentând omogenitate ridicată pentru aplicații clinice. Mai mult decât atât, performanța lor biologică este mai stabilă și mai previzibilă, întrucât tiparul molecular al MSC native se schimbă subtil între diferite loturi.

Astfel, **scopul** acestei tezei de doctorat a fost de a evalua efectele secretomului provenit de la celulele mezenchimale umane asupra procesului de vindecare a rănilor, atât *in vitro*, cât şi *in vivo* pe un model murin de rană. Pentru îndeplinirea acestui scop au fost propuse mai multe **obiective** utilizându-se surse celulare multiple, toate de origine umană.

Obiectiv 1. Obţinerea şi caracterizarea celulelor stromale mezenchimale (MSC) umane derivate din măduva osoasă și din țesutul adipos, precum și a fibroblastelor dermale umane primare sau obţinute din celule stem pluripotente induse umane.

Obiectiv 2. Testarea *in vitro* a secretomului provenit de la o linie imortalizată de MSC derivate din ţesut adipos (ADSC) urmărind efectul asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate.

Obiectiv 3. Studiu comparativ privind proprietăţile fibroblastelor dermale umane şi a MSC umane derivate din măduva osoasă cultivate în sistem bi- (2D) şi tridimensional (3D).

Obiectiv 4. Testarea *in vitro* a efectului secretomului provenit de la fibroblastele dermale primare şi de la fibroblastele derivate din celulele stem pluripotente induse umane cultivate în sistem 2D şi 3D asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate.

Obiectiv 5. Testarea *in vivo* a secretomului provenit de la fibroblastele dermale primare umane cultivate în sistem 2D şi 3D privind acţiunea acestuia asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate.

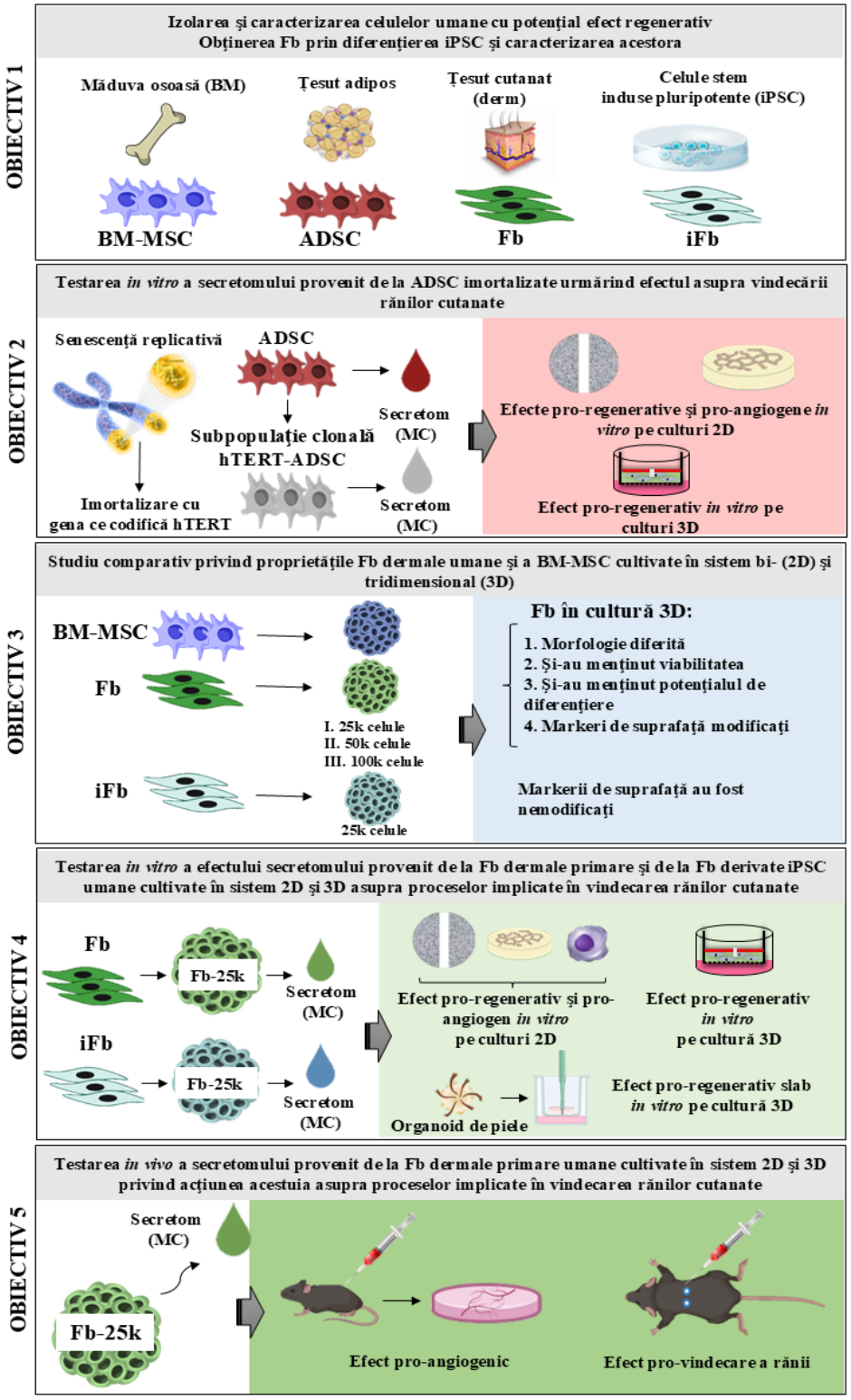
STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza este structurată în **9 capitole**, cuprinzând atât noţiuni teoretice privind stadiul actual al cunoştinţelor, cât şi rezultatele originale obţinute (partea de contribuţii originale).

Prima parte („Stadiul actual al cunoașterii") este structurată în ***4 capitole*** şi cuprinde date din literatură aduse la zi cu privire la subiectul vizat de această teză. Mai exact, în **capitolul I.1** este prezentată problematica rănilor cutanate, fiind vizate fundamentele anatomice şi fiziologice ale ţesutului cutanat, etapele vindecării rănilor alături de prezentarea succintă a perturbării procesului fiziologic întâlnit în cazul rănilor cronice, dar și abordările terapeutice actuale. **Capitolul I.2** vizează caracteristicile definitorii ale contribuţiei secretomului provenit de la MSC în procesul de vindecare al rănilor cutanate, punându-se accent pe caracterizarea MSC, descrierea compoziţiei secretomului provenit de la acestea, dar şi prezentarea metodelor actuale de potenţare a efectelor. De asemenea, sunt expuse studiile din literatură ce presupun utilizarea secretomului provenit de la celulele stromale mezenchimale drept potenţială terapie pentru rănile cutanate. **Capitolul I.3** se concentrează pe conceptul de utilizare a Fb ca alternativă a MSC, fiind prezentate similitudinile dintre acestea, dar şi studiile existente privind

aplicabilitatea secretomului provenit de la Fb drept posibilă terapie pentru rănile cutanate. În **Capitolul I.4** sunt prezentate potenţiale direcţii pentru obţinerea unei surse inepuizabile de celule mezenchimale: imortalizarea celulară, precum şi generarea acestora din iPSC. Unele date cuprinse în această parte fac parte dintr-un articol de tip *review* publicat anul acesta într-un jurnal indexat ISI: **Gheţu, D-.M.**, Raymond, K., Titorencu, I., Simionescu, M. **2025.** Innovative Strategies: Use of Stromal Cell-Derived Secretome for Chronic Wound Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(12), p.5609. 10.3390/ijms26125609 (IF/2024 = 4.9, Q1, AIS = 1.121).

A doua parte („Contribuţii originale”) este structurată în ***5 capitole*** care au avut la bază cele 5 obiective enunţate anterior. Astfel, pentru îndeplinirea obiectivelor propuse au fost utilizate tehnici precum cele de culturi celulare, citometrie în flux, biologie moleculară, histologie, precum şi teste pe animale, toate acestea fiind descrise în secţiunile „Materiale şi Metode” aferente fiecărui studiu. Conţinutul capitolelor este schematizat în figura de mai jos şi prezentat succint în cele ce urmează.



Schematizarea conținutului celor 5 capitole (obiective) cuprinse în partea a doua a tezei („Contribuții originale”). MC: mediu condiționat; hTERT: subunitatea catalitică a telomerazei umane.

Capitolul II.1 al tezei este asociat cu primul obiectiv (Obiectiv 1), fiind intitulat „**Obţinerea şi caracterizarea celulelor stromale mezenchimale (MSC) umane derivate din măduva osoasă și din țesutul adipos, precum și a fibroblastelor dermale umane primare sau obţinute din celule stem pluripotente induse umane**”. Acesta prezintă obţinerea de celule primare cu potențial regenerativ pentru vindecarea rănilor (MSC derivate din BM şi ţesut adipos şi Fb izolate de la nivelul dermului) şi caracterizarea acestora din punct de vedere al markerilor specifici şi al capacităţii de diferenţiere către liniile celulare mezodermice: linia adipogenă, osteogenă şi condrogenă. Mai mult decât atât, acesta este axat şi pe obţinerea Fb prin diferenţierea din iPSC şi caracterizarea acestora din punct de vedere al markerilor de suprafaţă şi intracelulari specifici (precum vimentina şi colagenul). Descrierea amănunțită a protocoalelor poate fi regăsită în secțiunea „Materiale și metode” aferentă acestui capitol. Rezultatele arată succesul izolării de celule primare care exprimă markerii specifici şi deţin capacitatea de diferenţiere către liniile celulare mezodermice. De asemenea, au fost obţinute Fb prin diferenţierea iPSC (iFb), exprimând markerii de suprafaţă şi intracelulari specifici. Aceste celule au fost folosite în experimentele *in vitro* şi *in vivo* pentru îndeplinirea celorlalte obiective propuse, care au ca scop utilizarea secretomului (mediului condiţionat) drept terapie „acelulară” pentru rănile cutanate.

Capitolul II.2 (Obiectiv 2) este intitulat „**Testarea *in vitro* a secretomului provenit de la o linie imortalizată de MSC derivate din ţesut adipos (ADSC) urmărind efectul asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate**”. În cadrul acestuia este prezentată generarea unei linii imortalizate de ADSC (subpopulaţie clonală) prin transducția lentivirală a genei care codifică transcriptaza inversă (componenta catalitică) a telomerazei umane (hTERT) pentru inhibarea fenomenului de senescenţă replicativă şi evaluarea *in vitro* a efectelor secretomului (mediului condiţionat) provenit de la aceste celule asupra proceselor cheie asociate vindecării rănilor cutanate. Pe scurt, s-a raportat impactul secretomului (mediului condiţionat) asupra proliferării și migrării keratinocitelor, Fb şi celulelor endoteliale, cât și asupra angiogenezei (procese care au loc în timpul fazei proliferative a vindecării rănilor). Totodată a fost demonstrat şi efectul de susținere a procesului de re-epitelizare a unei răni realizate pe un model de cultură organotipică de piele umană. Rezultatele expuse în acest capitol au fost cuprinse într-o lucrare publicată într-un jurnal indexat ISI: **Iacomi, D. M.**, Roşca A. M., Ţuţuianu, R., Neagu, T. P., Prună, V., Simionescu, M., Titorencu, I. **2022**. Generation of an

immortalized human adipose-derived mesenchymal stromal cell line suitable for wound healing therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16):8925. DOI: 10.3390/ijms23168925 (IF/2022 = 5.6, Q1, AIS = 1.028).

Capitolul II.3 (Obiectiv 3) intitulat „**Studiu comparativ privind proprietăţile fibroblastelor dermale umane şi a MSC umane derivate din măduva osoasă cultivate în sistem bi- (2D) şi tridimensional (3D)**" a implicat analiza comparativă a BM-MSC şi a Fb dermale primare umane (ca sursă celulară alternativă mult mai accesibilă)/diferenţiate din iPSC cultivate în sistem 3D (drept strategie de îmbunătăţire a capacităţii secretorii), mai exact în agregate celulare (sferoizi) obţinute prin cultivarea suspensiei celulare în picături suspendate („*hanging drops*"). Sferoizii/celulele primare din componenţa acestora au fost analizaţi/analizate din punct de vedere al morfologiei, viabilităţii, secreţiei componentelor matricei extracelulare, prezenţei moleculelor de adeziune, dar şi de menţinere al markerilor de suprafaţă specifici şi a potenţialului de diferenţiere către linia adipogenă, osteogenă şi condrogenă. Rezultatele au arătat că ambele tipuri celulare primare prezintă capacitatea de a agrega în sferoizi după 72 de ore, fiind detectată secreţia elementelor matricii extracelulare, menţinerea potenţialului de diferenţiere, însă şi unele modificări morfologice şi de prezenţă a markerilor de suprafaţă specifici. Din punct de vedere al viabilităţii nu s-au remarcat modificări semnificative în urma procesului de agregare. Fb diferenţiate din iPSC au format de asemenea sferoizi, menţinându-şi markerii de suprafaţă specifici în urma agregării. Datele originale cuprinse în acest studiu fac parte dintr-un articol în curs de redactare.

În **capitolul II.4** (Obiectiv 4) - „**Testarea *in vitro* a efectului secretomului provenit de la fibroblastele dermale primare şi de la fibroblastele derivate din celulele stem pluripotente induse umane cultivate în sistem 2D şi 3D asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate**" – sunt prezentate rezultatele obţinute *in vitro* privind evaluarea efectelor secretomului (mediului condiţionat) provenit de la Fb dermale primare cultivate în sistem 3D (sferoizi) asupra proceselor cheie asociate vindecării rănilor cutanate: inflamaţia, angiogeneza şi re-epitelizarea, comparativ cu efectele mediului condiţionat provenit de la Fb cultivate în monostrat (2D). S-a arătat creşterea secreţiei factorilor pro-angiogenici prin cultivarea tridimensională (3D) a Fb dermale umane primare sub formă de sferoizi (25000 celule/sferoid – 25k), îmbunătăţirea proceselor de migrare şi proliferare, cât şi de re-epitelizare la nivelul rănii pe un model 3D de cultură organotipică de piele în prezenţa mediului condiţionat

provenit de la aceste celule. Astfel, rezultatele obţinute confirmă faptul că secretomul provenit de la aceste celule cultivate în sistem 3D reprezintă astfel o posibilă strategie de tratament pentru vindecarea rănilor. Totodată, sunt prezentate şi rezultatele privind evaluarea secretomului obţinut de la Fb derivate din iPSC (iFb) cultivate atât în sistem 2D cât şi 3D (25000 celule/sferoid), însă nefiind evidenţiat un efect de potenţare a re-epitelizării pe un model 3D al unui echivalent de piele obţinut din organoizi. Datele originale cuprinse în acest studiu fac parte dintr-un articol în curs de redactare.

Ultimul capitol al părţii originale, **capitolul II.5** (Obiectiv 5) **-** „**Testarea *in vivo* a secretomului provenit de la fibroblastele dermale primare umane cultivate în sistem 2D şi 3D privind acţiunea acestuia asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate**" este asociat cu evaluarea *in vivo* a efectelor secretomului (mediului condiţionat) provenit de la Fb dermale primare cultivate în sistem 3D (sferoizi alcătuiţi din 25000 celule/25k) din punct de vedere al angiogenezei şi al procesului de re-epitelizare, comparativ cu efectele mediului condiţionat provenit de la Fb cultivate în monostrat. Pe scurt, rezultatele au arătat efectul benefic al secretomului provenit de la Fb dermale umane primare asupra angiogenezei şi a re-epitelizării rănilor cutanate, utilizându-se tehnica Matrigel *plug assay* şi un model de rană la şoareci. Datele originale cuprinse în acest studiu fac de asemenea parte dintr-un articol în curs de redactare.

Conţinutul tezei se încheie cu referințele bibliografice aferente.

CONTRIBUŢII PERSONALE

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ŞI COMUNICATE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL

Lucrări publicate în reviste indexate ISI – autor principal

1. **Gheţu, D.-M**, Raymond, K., Titorencu, I., Simionescu, M. **2025**. Innovative Strategies: Use of Stromal Cell-Derived Secretome for Chronic Wound Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(12). DOI: (IF/2024 = 4.9, Q1, AIS = 1.121).

2. Sorca†, B. V., Kaya, D. A., Kaya, M. G. A., Enăchescu, M., **Ghetu†, D.-M.**, Enache, L.-B., Boeraşu, I., Coman, A. E., Rusu, L. C., Constantinescu, R., Titorencu, I. **2025**. Bone Fillers

with Balance Between Biocompatibility and Antimicrobial Properties. *Biomimetics*, 10(2), 100. DOI: 10.3390/biomimetics10020100 (IF/2023 = 3.4, Q2, AIS = 0.567).

3. **Iacomi, D. M.**, Roşca A. M., Ţuţuianu, R., Neagu, T. P., Prună, V., Simionescu, M., Titorencu, I. **2022**. Generation of an immortalized human adipose-derived mesenchymal stromal cell line suitable for wound healing therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16):8925. DOI: 10.3390/ijms23168925 (IF/2022 = 5.6, Q1, AIS = 1.028).

Lucrări publicate în reviste indexate ISI – co-autor

1. Ţuţuianu, R., Roşca, A. M., **Iacomi, D. M.**, Simionescu, M., Titorencu, I. **2021**. Human mesenchymal stromal cell-derived exosomes promote *in vitro* wound healing by modulating the biological properties of skin keratinocytes and fibroblasts and stimulating angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6239. DOI: 10.3390/ijms22126239 (IF/2021 = 5.924, Q1, AIS = 1.064).

Colaborator la un capitol într-o monografie publicată în străinătate

1. Roșca, A.M., Ţuţuianu, R., **Ghetu, D.M.**, Titorencu, I., **2023.** Mesenchymal stromal cells for wound healing therapy: From expectations to reality. In: K.H. Haider, ed. *Handbook of Stem Cell Applications*. Singapore: Springer. DOI: 10.1007/978-981-99-0846-2_53-1.

Lucrări în curs de redactare

1. **Gheţu, D.-M.**, Ţuţuianu, R., Titorencu, I., Roşca, A.M. The secretome of human dermal fibroblasts spheroids supports skin regeneration by promoting the remodeling of the extracellular matrix on a full thickness wound mouse model.

2. **Gheţu D.-M.,** Ramovs V., Flesseman M., Titorencu I., Raymond K., A Novel FullThickness In Vitro Human Wound Model Based on Organoid-derived Skin Equivalent.

Comunicări susținute la manifestări ştiinţifice internaţionale şi naţionale - autor principal

Prezentări orale (2):

1. **Gheţu D.M.,** Roşca A.M., Ţuţuianu R., Neagu T.P., Prună V., Simionescu M., Titorencu I. Aggregates of dermal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells exhibit different characteristics: implications for regenerative therapy, „*International Conference and XXXIX Scientific Session of the Romanian Society of Cell Biology*”, 21-23 octombrie 2022, Cluj, România.

2. **Iacomi D.M.**, Roşca A.M., Ţuţuianu R., Prună V., Titorencu I., Simionescu M. Generation and characterization of an immortalized human adipose mesenchymal stromal cell line, *International Conference under the aegis of the Romanian Academy 42nd Anniversary Symposium of the Institute of Cellular Biology and Pathology ,,Nicolae Simionescu" held jointly with 38th annual scientific session of The Romanian Society for Cell Biology*, 4-6 noiembrie 2021, conferinţă online.

Postere (3):

1. **Gheţu D. M.**, Ţuţuianu R., Albu Kaya M. G., Roşca A. M., Titorencu I. Development of three-dimensional intestinal organotypic models using various collagen-based dermal equivalents", poster prezentat la conferinţa internaţională „*Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering (NanoBioMat)*", 25-27 iunie, 2025 (ediţia de vară), participare online.
2. **Gheţu D.M.**, Ţuţuianu R., Roşca A.M., Simionescu M., Titorencu I., Three-dimensional aggregation stimulates the pro-angiogenic properties of adult human dermal fibroblasts, poster prezentat la simpozionul aniversar cu participare internaţională *,,Aspiraţie, inspiraţie şi inovaţie în explorarea de noi frontiere în cercetarea biomedicală"* – organizat cu ocazia a 45 de ani de existenţă a Institutului de Biologie şi Patologie Celulară ,,Nicolae Simionescu", 17-18 decembrie 2024, Bucureşti, România.
3. **Gheţu D.M.**, Roşca A.M., Ţuţuianu, R., Prună, V., Simionescu, M., Titorencu, I., Human dermal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells display different characteristics when cultured in 3D settings, poster prezentat la simpozionul ştiinţific anual al Institutului de Biologie şi Patologie Celulară ,,Nicolae Simionescu" cu participare internaţională *,,43 years on the never-ending road of cardiovascular discoveries"*, 8-9 decembrie 2022, Bucureşti, România.

Postere susținute la manifestări ştiinţifice naţionale şi internaţionale (co-autor)

1. Ţuţuianu R., **Gheţu D.M.**, Titorencu I., Roşca A.M.. Mediul condiţionat derivat de la fibroblaste cultivate în sferoizi promovează regenerarea pielii pe un model murin de rană cutanată, poster prezentat la manifestaţia ştiinţifică: Simpozionul ARSAL 2024 *,,Evaluarea severității și conceptul 3R în proiectele ce folosesc animale în experimentare"*, organizat de Asociaţia Română pentru Ştiinţa Animalelor de Laborator, găzduită de Institutul Național de

Cercetare-Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș", 29 martie 2024, Bucureşti, România.

2. Prună V., **Gheţu D.M.**, Vrânceanu D., Cotruţ C., Vlădescu (Dragomir) A., Titorencu I., Enhanced osteogenic differentiation of human adult mesenchymal stem cells cultured on plate-like hydroxyapatite coatings, conferinţa ştiinţifică internaţională *„Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering (NanoBioMat)"*, 28-30 iunie 2023 (Ediţia de vară) – participare online.

3. Ţuţuianu R., Roşca A.M., **Gheţu D.M.**, Prună V., Albu Kaya M. Evaluation of mesenchymal cells-derived products as therapeutics for skin regeneration, poster prezentat la manifestaţia ştiintifică *„1st NETSKINMODELS Network event"* organizată la Bratislava, Slovacia, 14-18 februarie 2023.

4. Rădulescu A. L., **Iacomi D.M.**, Florea G., Roşca A. M., Tutuianu R., Titorencu I. Obţinerea şi caracterizarea celulelor stem mezenchimale derivate din ţesut adipos, *Conferința dedicată Zilei Internaționale a Microorganismelor (ZIM)*, 17 septembrie 2021, Bucureşti, România.

Brevete naționale înregistrate

1. Aplicaţie OSIM nr. A/00370 (25.06.2021): „Hidrogeluri polimerice compozite cu proprietăţi antibacteriene şi cicatrizante şi procedeu de obţinere a acestora"; Autori: Simionescu M., Roşca A.M., Titorencu I.D., **Iacomi M.D.**, Ţuţuianu R., Prună V., Lasca I., Chercheriţă I.A., Neagu P.T., Mogoantă L., Mogoşanu G.D., Pirici N.D., Streba C.T., Birca A.C., Burduşel A.C., Stoica A.E., Grumezescu A.L., Chircov C.

CURSURI ŞI SEMINARII EFECTUATE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL

1. Training School (Școala de formare) "3D Skin Cultures" organizată în cadrul acțiunii COST CA21108 – Rețeaua Europeană pentru Ingineria și Modelarea Pielii (NETSKINMODELS) – 29 iunie-2 iulie 2025, Nijmegen, Țările de Jos.

2. Prof. Dimitris Kardassis: Lectures to the students (Lipoprotein pathways and their roles in the pathophysiology of atherosclerosis; Transcriptional Regulation of Cardiovascular Genes: Basic principles and methodologies *in vitro* and *in vivo*; Hormone Nuclear receptors: from basic

biology to clinical exploitation in cardiovascular disease), 14-18 noiembrie 2024, Institutul de Biologie şi Patologie Celulară ,,Nicolae Simionescu'', Bucureşti, România.

3. Curs de formare realizat la Universitatea de Medicină şi Farmacie ,,Carol Davila'' din Bucureşti intitulat ,,*Ştiinţa animalelor de laborator"* în perioada 30.01-10.02.2023.

4. INTERA-1 Summer School ,,*Encapsulation of cells and drugs: materials, procedures and applications"*, 13-14 mai 2021, Institutul de Biologie şi Patologie Celulară ,,Nicolae Simionescu'', Bucureşti, România.

5. INTERA Online Workshop ,,*Recent advances in the field of obtaining nanovectors for gene transfection*'', 22 aprilie 2021, Institutul de Biologie şi Patologie Celulară ,,Nicolae Simionescu'', Bucureşti, România.

6. THERAVALDIS Online Workshop ,,*Diabetes in cardiovascular diseases; pathogenic mechanisms and targeted therapies*'', 27 noiembrie 2020, Institutul de Biologie şi Patologie Celulară ,,Nicolae Simionescu'', Bucureşti, România.

7. DIABETER Online Workshop *,,A new therapeutic tool in autoimmune diabetes: Mesenchymal Stromal Cell"*, 20 noiembrie 2020, Institutul de Biologie şi Patologie Celulară ,,Nicolae Simionescu'', Bucureşti, România.

STAGII INTERNAŢIONALE

1. Stagiu internaţional cu o durată de 9 luni (1.09.2023-31.05.2024) realizat la Centrul Medical al Universităţii din Leiden, Ţările de Jos, beneficiind de o bursă acordată de Ministerul Educației din România (conform HG 118/2023).

PREMII

1. Premiul oferit de Ministerul Educației și Cercetării și UEFISCDI ,,Realizări științifice – Articol original '', PN IV, Program 5.2 - Resurse umane – Subprogram 5.2.3 – Suport – Lista 1 – Primele aplicaţii trimise pentru articolele din 2021 şi 2022_13.03.2023 pentru articolul ,,Generation of an immortalized human adipose-derived mesenchymal stromal cell line suitable for wound healing therapy'' publicat în revista ,,International Journal of Molecular Sciences'', Volumul 23 (16), 8925, având factorul de impact în 2022 = 5.6 (**Iacomi, D. M.**, Roşca, A. M., Ţuţuianu, R., Neagu, T. P., Prună, V., Simionescu, M., Titorencu, I.).

2. Premiul oferit de Ministerul Educației și Cercetării și UEFISCDI „Realizări științifice – Articol original ”, Subprogramul 1.1 - Resurse umane - Acordarea rezultatelor cercetării - Articole, Concurență 2021, Rezultatele evaluării_Lista 2 - Cereri de premiere depuse pentru articolele publicate în 2021_18.11.2021 - pentru articolul „Human mesenchymal stromal cell-derived exosomes promote in vitro wound healing by modulating the biological properties of skin keratinocytes and fibroblasts and stimulating angiogenesis” publicat în revista „International Journal of Molecular Sciences”, Volumul 22(12), 6239, 2021, având factorul de impact în 2021 = 5.924 (Ţuţuianu, R., Roşca, A. M., **Iacomi, D. M.**, Simionescu, M., Titorencu, I.).

BURSE OBȚINUTE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL ȘI FINANŢAREA CERCETĂRILOR

BURSE

1. Bursă acordată de către Ministerul Educaţiei pentru realizarea unui stagiu de cercetare în străinătate (conform HG 118/2023) la Centrul Medical al Universităţii din Leiden, Ţările de Jos cu durată de 9 luni (1.09.2023-31.05.2024).
2. Bursă de doctorat - Şcoala de Studii Avansate a Academiei Române (2020-2023).

COLABORĂRI ÎN PROIECTE DE CERCETARE

Colaborator în granturi naționale:

1. **PN-IV-P7-7.1-PED-2024-1446**

Proiect experimental demonstrativ

Titlul proiectului**:** Substituenţi inovativi cu structură tridimensională şi activitate antimicrobiană pe bază de colagen pentru reconstrucţia cranio-facială (*Innovative antimicrobial collagen based three dimensional scaffolds for craniofacial reconstruction*)

Perioada: 2025-2027

Coordonator: Institutul de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, Bucureşti

Director de proiect: Dr. Irina Titorencu

Partener: LMS PLASTIC SURGERY CLINIQUE SRL – Dr. Ana Căruntu

2. **PN-III-P1-1.1-TE-2021-1344**

Proiect de cercetare pentru stimularea constituirii de tinere echipe de cercetare independente

Titlul proiectului: Îmbunătățirea proprietăților paracrine ale fibroblastelor prin agregare tridimensională pentru terapia rănilor cronice *(Enhancing the paracrine properties of fibroblasts by three-dimensional aggregation for chronic wounds therapy)* - FIBROTHER

Perioada: 2022-2024

Director de proiect: Dr. Roşca Ana-Maria

3. **PN-III-P2-2.1-PED-2021-4275**

Proiect experimental demonstrativ

Titlul proiectului: Optimizarea interacţiunii celulelor stem mezenchimale umane cu structuri biomimetice inovative cu aplicabilitate în ingineria tisulară *(Optimization of human mesenchymal stem cells interaction with innovative biomimetic structures for tissue engineering applications)* - BioMimCells

Perioada: 2022-2024

Coordonator: Universitatea Politehnica Bucureşti

Director de proiect: Dr. ing. Diana Maria Vrânceanu

Parteneri:

Institutul de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, Bucureşti - Responsabil partener: Dr. Irina Titorencu

Institutul National de Cercetare şi Dezvoltare în Optoelectronică (INOE 2000) - Responsabil partener: Dr. Alina Vlădescu

4. **PN III PCCDI 45/2018**

Proiecte complexe realizate în consorţii Cercetare Dezvoltare Inovare

Titlul proiectului: Nanostructuri bioactive pentru strategii terapeutice inovatoare (*Bioactive Nanostructures for Innovative Therapeutic Strategies*) - NANOLIFE

Perioada: 2018-2020

Coordonator: Universitatea de Medinică şi Farmacie din Craiova

Director de proiect: Dr. Laurenţiu Mogoantă

Parteneri:

Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București – Responsabil partener: Dr. Ioan Lascăr

Institutului de Biologie şi Patologie Celulară ,,Nicolae Simionescu'', Bucureşti – Responsabil partener: Dr. Irina Titorencu

Universitatea Politehnica Bucureşti - Responsabil partener: Dr. Alexandru Grumezescu

Colaborator în granturi internaționale:

1. **PNRR–III-C9-2022-I8 CF 197/15.11.2022**

Planul Național de Recuperare și Reziliență al României (*Romania's National Recovery and Resilience Plan*) - Proiect finanţat de către Uniunea Europeană

Titlul proiectului: Îmbunătăţirea potențialului endogen anti-oxidant și de îndepărtare a colesterolului prin editare genică în boala ficatului gras; studii preclinice *(Enchancing the endogenous anti-oxidant and cholesterol removal potential by gene editing in fatty liver disease; pre-clinical studies)* - THERAGENLIV

Perioada: 2023-2026

Director de proiect: Prof. Shlomo Sasson

2. ***European Cooperation in Science and Technology***

***CA21108 - European Network for Skin Engineering and Modeling* (NETSKINMODELS)**

Perioada: 2022-2026

Director de proiect: Prof. Sandrine Dubrac

REFERINŢE

1. Ahangar, P., Mills, S.J. and Cowin, A.J., 2020. Mesenchymal stem cell secretome as an emerging cell-free alternative for improving wound repair. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(19), pp.7038.
2. Chalak, M., Hesaraki, M., Mirbahari, S.N., Yeganeh, M., Abdi, S., Rajabi, S. and Hemmatzadeh, F., 2024. Cell immortality: in vitro effective techniques to achieve and investigate its applications and challenges. *Life*, *14*(3), pp.417.
3. Chen, M., Przyborowski, M. and Berthiaume, F., 2009. Stem cells for skin tissue engineering and wound healing. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, *37*(4-5), pp.399-421.
4. de Bardet, J.C., Cardentey, C.R., González, B.L., Patrone, D., Mulet, I.L., Siniscalco, D. and Robinson-Agramonte, M.D.L.A., 2023. Cell immortalization: in vivo molecular bases and in vitro techniques for obtention. *BioTech*, *12*(1), pp.14.
5. Enzerink, A., Rantanen, V. & Vaheri, A. 2010. Fibroblast nemosis induces angiogenic responses of endothelial cells. *Exp Cell Res,* 316**,** pp.826-35.

6. Eom, Y.W., Lee, J.E., Yang, M.S., Jang, I.K., Kim, H.E., Lee, D.H., Kim, Y.J., Park, W.J., Kong, J.H., Shim, K.Y. and Lee, J.I., 2011. Rapid isolation of adipose tissue-derived stem cells by the storage of lipoaspirates. *Yonsei Medical Journal*, *52*(6), pp.999-1007.
7. Falanga, V., 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet*, *366*(9498), pp.1736-1743.
8. Ferreira, J.R., Teixeira, G.Q., Santos, S.G., Barbosa, M.A., Almeida-Porada, G. and Gonçalves, R.M., 2018. Mesenchymal stromal cell secretome: influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Frontiers in Immunology*, *9*, pp.2837.
9. Guillamat-Prats, R., 2021. The role of MSC in wound healing, scarring and regeneration. *Cells*, *10*(7), pp.1729.
10. Ha, D.H., Kim, H.K., Lee, J., Kwon, H.H., Park, G.H., Yang, S.H., Jung, J.Y., Choi, H., Lee, J.H., Sung, S. and Yi, Y.W., 2020. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration. *Cells*, *9*(5), pp.1157.
11. Haider, H.K. and Ashraf, M., 2010. Preconditioning and stem cell survival. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, *3*, pp.89-102.
12. Huang, H.I., Chen, S.K., Ling, Q.D., Chien, C.C., Liu, H.T. and Chan, S.H., 2010. Multilineage differentiation potential of fibroblast-like stromal cells derived from human skin. *Tissue Engineering Part A*, *16*(5), pp.1491-1501.
13. Ivanković, M., Ćukušić, A., Gotić, I., Škrobot, N., Matijašić, M., Polančec, D. and Rubelj, I., 2007. Telomerase activity in HeLa cervical carcinoma cell line proliferation. *Biogerontology*, *8*, pp.163-172.
14. Keating, A., 2006. Mesenchymal stromal cells. *Current Opinion in Hematology*, *13*(6), pp.419-425.
15. Kuhbier, J.W., Weyand, B., Radtke, C., Vogt, P.M., Kasper, C. and Reimers, K., 2010. Isolation, characterization, differentiation, and application of adipose-derived stem cells. *Bioreactor systems for tissue engineering II: strategies for the expansion and directed differentiation of stem cells*, pp.55-105.
16. Lazarus, G.S., Cooper, D.M., Knighton, D.R., Margolis, D.J., Percoraro, R.E., Rodeheaver, G. and Robson, M.C., 1994. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound Repair and Regeneration*, *2*(3), pp.165-170.
17. Lu, G., Haider, H., Porollo, A. & Ashraf, M. 2010. Mitochondria-specific transgenic overexpression of connexin-43 simulates preconditioning-induced cytoprotection of stem cells. *Cardiovasc Res,* 88**,** pp.277-86.

18. Lu, K., Li, H.Y., Yang, K., Wu, J.L., Cai, X.W., Zhou, Y. and Li, C.Q., 2017. Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy for intervertebral disc degeneration: in-vitro study on exosomes in interaction of nucleus pulposus cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, *8*, pp.1-11.
19. Nunan, R., Harding, K.G. and Martin, P., 2014. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Disease Models & Mechanisms*, *7*(11), pp.1205-1213.
20. Paul, W. and Sharma, C.P., 2004. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends Biomater Artif Organs*, *18*(1), pp.18-23.
21. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. and Marshak, D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, *284*(5411), pp.143-147.
22. Reinke, J.M. and Sorg, H., 2012. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, *49*(1), pp.35-43.
23. Robson, M.C., Steed, D.L. and Franz, M.G. 2001. Wound healing; biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Problems Surg*, *38*, pp.61-140.
24. Gottipamula, S., Bhat, S. and Seetharam, R.N., 2018. Mesenchymal Stromal Cells: Basics, Classification, and Clinical Applications. *Journal of Stem Cells*, *13*(1).
25. Ullah, I., Subbarao, R.B. and Rho, G.J., 2015. Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, *35*(2), pp.e00191.
26. Vaheri, A., Enzerink, A., Räsänen, K. and Salmenperä, P., 2009. Nemosis, a novel way of fibroblast activation, in inflammation and cancer. *Experimental Cell Research*, *315*(10), pp.1633-1638.
27. Vizoso, F.J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J. and Perez-Fernandez, R., 2017. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(9), pp.1852.
28. Wei, X., Yang, X., Han, Z.P., Qu, F.F., Shao, L. and Shi, Y.F., 2013. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, *34*(6), pp.747-754.
29. Zarei, F. and Soleimaninejad, M., 2018. Role of growth factors and biomaterials in wound healing. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, *46*(sup1), pp.906-911.

ŞCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE

INSTITUTUL DE BIOLOGIE ŞI PATOLOGIE CELULARĂ
„NICOLAE SIMIONESCU" AL ACADEMIEI ROMÂNE

TEZĂ DE DOCTORAT

Identificarea şi analiza microARN asociaţi lipoproteinelor serice; corelaţii cu parametrii clinici şi biochimici ai pacienţilor cu boli cardiovasculare

REZUMAT

Conducător ştiinţific:
Acad. ANCA V. SIMA

Doctorand:
NATALIA SIMIONESCU

BUCUREŞTI
2017

CUPRINS

CUVÂNT ÎNAINTE **1**
INTRODUCERE ŞI OBIECTIVE **3**
LISTĂ ABREVIERI **6**

PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOŞTINŢELOR
I.1. ATEROSCLEROZA ARTERELOR CORONARE **8**
Structura inimii 8
Fiziologia inimii 10
Circulaţia coronariană 11
Formarea plăcii aterosclerotice 12
Ateroscleroza arterelor coronare 15
Boala coronariană stabilă 17
Sindromul coronarian acut 18

I.2. LIPOPROTEINE SERICE **19**
Proprietăţile şi compoziţia principalelor lipoproteine serice umane 19
Metabolismul lipoproteinelor serice 23
Lipoproteine pro-aterogene 28
Lipoproteine anti-aterogene – HDL 29

I.3. MICRO-ARN PREZENŢI ÎN CIRCULAŢIA SANGVINĂ **32**
Nomenclatura miRNA 33
Organizarea genomică a microARN 34
Biosinteza microARN 34
MicroARN implicaţi în metabolismul LDL 38
MicroARN implicaţi în metabolismul HDL 39
MicroARN ce influenţează evoluţia plăcii aterosclerotice 40
MicroARN circulanţi 42
MicroARN în circulaţia sangvină a pacienţilor cu boli cardiovasculare şi patologii asociate 44
Problematica investigării miRNA prezenţi în circulaţia sangvină 46

PARTEA II – CONTRIBUŢII ORIGINALE

OBIECTIVELE GENERALE ALE PROIECTULUI 48

II.1. IDENTIFICAREA ŞI ANALIZA MICRO-ARN ÎN SERURI ŞI LIPOPROTEINE IZOLATE DE LA PACIENŢI HIPERLIPIDEMICI ŞI/SAU HIPERGLICEMICI 49

Introducere şi obiective 49

Protocoale experimentale şi metode de analiză 50

Selecţia pacienţilor şi încadrarea în grupe 50

Metode de analiză a parametrilor lipidici şi inflamatori în serul pacienţilor 51

Izolarea lipoproteinelor prin ultracentrifugare în gradient de densitate 54

Izolarea microARN din ser şi lipoproteine 55

Realizarea profilului microARN serici (screening) 56

Revers-transcrierea microARN şi real time-PCR cantitativ 57

Analiza statistică a datelor 58

Rezultate 59

Parametrii serici lipidici şi inflamatori 59

Profilul microARN în seruri hiperlipidemice şi/sau hiperglicemice 59

Analiza microARN selectaţi în serurile individuale 67

Corelarea nivelurilor de microARN serici cu parametrii lipidici şi inflamatori 70

Asocierea microARN cu lipoproteinele serice 73

Discuţii şi concluzii 74

II.2. IDENTIFICAREA ŞI ANALIZA MOLECULELOR DE MICRO-ARN SERICE SAU ASOCIATE CU LIPOPROTEINE IZOLATE DE LA PACIENŢI CU BOLI CORONARIENE 78

Introducere şi obiective 78

Protocoale experimentale şi metode de analiză 79

Selecţia pacienţilor cu boală coronariană (CAD); criterii clinice 79

Metode de analiză a parametrilor serici lipidici şi inflamatori 82

Protocoale de izolare şi caracterizare a lipoproteinelor serice 83

Izolarea microARN din seruri şi lipoproteine 84

Analiza profilului seric al unor microARN asociaţi cu CAD 84

Revers-transcrierea microARN şi real time-PCR cantitativ 85
Analiza statistică a datelor 86
Rezultate **87**
Parametrii serici şi caracteristicile clinice ale pacienţilor 87
Profilul microARN în serurile pacienţilor CAD 90
Analiza microARN selectaţi în serurile pacienţilor CAD 95
Distribuţia microARN în lipoproteine de la pacienţi CAD 97
Distribuţia microARN în lipoproteine izolate de la pacienţi CAD după 12 luni de la includerea în studiu 100
Discuţii şi concluzii **102**

II.3. EFECTUL HIPERGLICEMIEI ASUPRA MICRO-ARN CIRCULANŢI ŞI STIMULAREA PRODUCŢIEI DE MICRO-ARN ÎN MACROFAGE UMANE ÎN CULTURĂ DE CĂTRE SERURILE HIPERGLICEMICE DE LA PACIENŢI CU BOLI CORONARIENE **105**
Introducere şi obiective **105**
Protocoale experimentale şi metode de analiză **106**
Selecţia pacienţilor; criterii clinice 106
Metode de analiză a parametrilor serici 107
Izolarea şi caracterizarea lipoproteinelor serice 108
Analiza miRNA în seruri şi lipoproteine 108
Culturi celulare şi model experimental 108
Analiza miRNA şi a expresiei genice în macrofagele THP-1 109
Analiza statistică 111
Rezultate **111**
Caracteristicile clinice şi parametrii serici ale pacienţilor 111
Analiza microARN în serurile pacienţilor CAD normoglicemici şi hiperglicemici 113
Analiza microARN în HDL izolate din serurile pacienţilor CAD normoglicemici şi hiperglicemici 117
Serurile ACS induc creşterea expresiei genice a proteinelor maşinăriei de procesare şi producţia miRNA în macrofagele umane 120
Concentraţiile crescute de glucoză cresc producţia miRNA în macrofage umane expuse la serurile pacienţilor CAD 122
Discuţii şi concluzii **124**

III. CONCLUZII GENERALE **127**
PERSPECTIVE **127**

IV. BIBLIOGRAFIE **128**

Lucrări publicate în cadrul tezei de doctorat **154**
Rezumate ale lucrărilor prezentate la manifestări ştiinţifice **155**
Specializări şi cursuri efectuate **158**
Premii naţionale obţinute **159**
Burse câştigate prin competiţie pentru participarea la manifestări ştiinţifice internaţionale **159**
Finanţarea cercetărilor **160**

Cuvinte cheie: ateroscleroză, microARN, hiperlipidemie, hiperglicemie, boală coronariană, angină stabilă, sindrom coronarian acut, lipoproteine, model regresie logistică, biostatistică, monocite/macrofage.

Număr total pagini – 160
Număr de figuri în partea I - 15
Număr de tabele în partea I - 2
Număr de figuri în partea II - 16
Număr de tabele în partea II - 17
Indicaţii bibliografice - 335

Lucrări publicate în reviste internaţionale cotate ISI – 3 (3 autor principal)
Rezumate publicate în reviste indexate ISI – 5 (1 autor principal)
Lucrari publicate în reviste BDI – 1 (autor principal)
Rezumate publicate în reviste indexate BDI – 1
Lucrări în pregătire – 2
Comunicări orale la manifestări ştiinţifice internaţionale – 4
Postere la manifestări ştiinţifice internaţionale – 10
Postere la manifestări ştiinţifice naţionale – 2
Specializări şi cursuri efectuate – 11
Premii naţionale – 4
Burse câştigate prin competiţie pentru participarea la manifestări ştiinţifice internaţionale – 2 (FEBS, EAS)
Participarea la proiecte de cercetare naţionale – 4

Bolile cardiovasculare (CVD) sunt cauza principală de morbiditate şi mortalitate în lume, în ciuda cercetărilor ample şi a terapiilor aflate în continuă îmbunătăţire. Ateroscleroza şi complicaţiile sale sunt responsabile de iniţierea şi evoluţia a mare parte din bolile cardiovasculare. Ateroscleroza este o boală cronică inflamatorie, generată sau agravată de dereglări ale metabolismului lipidelor şi al glucozei [1-3].

Boala arterelor coronare (*coronary artery disease*, CAD) este rezultatul dezvoltării plăcilor aterosclerotice în peretele arterelor coronare. În primele stadii de formare a plăcii, celulele endoteliale se activează şi virează către un fenotip secretor, ducând la dezvoltarea unei lamine bazale hiperplazice şi la expresia de molecule chemoatractante ce duc la recrutarea celulelor inflamatoare din sânge [4]. Monocitele circulante aderă la endoteliu, pătrund în subendoteliu şi se diferenţiază în macrofage, devenind actorii principali în evoluţia plăcii aterosclerotice [5]. Proteinele serice, lipoproteinele aterogene (LDL) şi lipoproteinele anti-aterogene (HDL) ajung în subendoteliu prin transcitoză *via* celulele endoteliale [6]. Lipoproteinele se acumulează în lamina bazală hiperplazică şi în matricea extracelulară, suferă modificări şi interacţionează cu macrofagele, ducând la încărcarea acestora cu lipide şi formarea celulelor spumoase [4].

Progresul şi stabilitatea plăcii aterosclerotice sunt dificil de evaluat şi de aceea este importantă găsirea unor metode neinvazive pentru a urmări evoluţia CAD şi, în special, a sindromului coronarian acut (ACS). De asemenea, un aspect important este diagnosticul timpuriu şi identificarea unor noi ţinte moleculare ce pot ajuta la o intervenţie terapeutică rapidă, care poate îmbunătăţi prognosticul.

Din întregul genom, secvenţele care codează sinteza proteinelor reprezintă mai puţin de 3%, în timp ce restul genomului este alcătuit din secvenţe necodante, care produc molecule de ARN active funcţional, cu roluri importante în reglarea homeostaziei tisulare şi a condiţiilor patofiziologice.

MicroARN (miRNA) sunt molecule de ARN mici (18-25 nucleotide), monocatenare, necodante, ce reglează post-transcripţional expresia genică prin inhibiţia translaţiei şi/sau promovarea degradării ARN mesager (ARNm), datorate împerecherii parţiale sau complete cu regiunile 3'-UTR ale ARNm [7, 8]. Împreună cu alte mecanisme moleculare, miRNA sunt reglatori genici post-transcripţionali puternici [9].

În nucleu, miRNA sunt transcrişi de către ARN polimeraza II ca pri-miRNA [10] şi procesaţi mai departe în pre-miRNA de către complexul microprocesor alcătuit din RNaza III Drosha împreună cu subunitatea sa reglatoare DGCR8 [11, 12]. Pre-miRNA sunt apoi transportaţi activ în citoplasmă de către Exportina-5 [13], unde sunt clivaţi în intermediari miRNA de tip duplex de către RNaza III Dicer [14]. Apoi,

catena miRNA conducătoare este selectată şi încărcată în complexul de silenţiere indus de miRNA (miRISC) ce reglează expresia genelor ţintă [14].

MiRNA pot fi exportaţi în spaţiul extracelular şi pot circula în fluxul sangvin asociaţi cu microparticule, exozomi, lipoproteine sau complexe proteice, putând acţiona ca mesageri extracelulari la distanţă mare [15-18].

MicroARN au roluri importante în patologie, fiind molecule de răspuns la stres şi având expresii modificate în cursul evoluţiei bolilor [19, 20]. Expresia celulară modificată a miRNA şi profilul alterat al miRNA circulanţi au fost asociate cu diferite tulburări, incluzând diferite tipuri de cancer, bolile neuro-degenerative, ateroscleroza, obezitatea, diabetul sau boala coronariană [21-25]. Profilul miRNA circulanţi poate reflecta modificarea expresiei tisulare sau a comunicării intercelulare, sugerând posibila utilizare a lor ca biomarkeri [26].

Evoluţia bolii aterosclerotice este influenţată de prezenţa factorilor de risc cum ar fi dislipidemia (în special hipercolesterolemia), hipertensiunea şi diabetul [27]. Studiile realizate până la ora actuală arată rolul major al microARN în modularea căilor metabolice implicate în aceste afecţiuni.

Prima parte a tezei de doctorat reprezintă **stadiul actual al cunoştinţelor** şi este structurată în 3 capitole ce abordează noţiuni teoretice despre ateroscleroza arterelor coronare, lipoproteinele serice şi biologia microARN.

Partea a doua a tezei prezintă **rezultatele originale obţinute în cadrul studiilor doctorale** şi este structurată pe 3 capitole, primele 2 reprezentând studii *in vivo* pe grupuri de pacienţi cu hiperlipidemie/hiperglicemie sau boli coronariene, iar al 3-lea capitol abordând în plus şi experimente *in vitro* pe modele de culturi celulare.

Astfel, lucrarea de faţă a avut 3 **obiective specifice**:

Obiectiv 1. Identificarea şi analiza microARN în seruri şi lipoproteine izolate de la pacienţi hiperlipidemici şi/sau hiperglicemici.

Obiectiv 2. Identificarea şi analiza microARN serici şi a celor asociaţi cu lipoproteine izolate de la pacienţi cu boală coronariană.

Obiectiv 3. Evaluarea modulării producţiei de microARN în macrofage umane în cultură de către serurile de la pacienţi cu boli coronariene.

Pentru atingerea acestor obiective am utilizat tehnici de biochimie, biologie moleculară şi biologie celulară, dintre care am adaptat **unele metode noi** în laborator. Astfel, am adaptat **metoda ELISA** pentru cuantificarea apolipoproteinelor A-I, B100 şi E şi a interleukinei 1β în serul pacienţilor investigaţi, pornind de la un kit ELISA de dezvoltare de metodă. Astfel, am redus consumul de reactivi şi de probă utilizaţi pentru măsurătoare.

Pentru **izolarea miRNA din lipoproteine**, am adaptat în laborator metoda descrisă de producător pentru izolarea miRNA cu kitul miRNeasy pentru ser/plasmă (Qiagen, Dusseldorf, Germany), utilizând 300 µL lipoproteine izolate (corespunzând la 120 µg proteină totală) şi mimic sintetic cel-miR-39 ca miRNA de referinţă pentru normalizarea conţinutului de miRNA în biofluide.

Am optimizat metoda descrisă de producător pentru **revers-transcrierea miRNA**, utilizând un amestec de amorse stem-loop specifice şi realizând o singură reacţie de revers-transcriere per probă pentru toate miRNA. Astfel, am reuşit să reducem semnificativ consumul de reactivi fără a compromite valoarea datelor obţinute.

Am pus la punct un **protocol nou de revers-transcriere dual a ARN** celular (izolat din macrofage umane în cultură), utilizând kit-ul de revers-transcriere High Capacity cDNA Reverse Transcription, amorse pentru revers-transcriere cu secvenţă aleatorie (*random primers*) şi un amestec de amorse TaqMan stem-loop miRNA-specifice (toate de la Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), pe un sistem PCR Veriti. Astfel, am redus consumul de reactivi şi de probă, realizând o singură reacţie de revers-transcriere per probă, cu rezultate optime.

Am elaborat **modele de regresie logistică binară** pentru estimarea riscului de evenimente coronariene, folosind programul SPSS for Windows v21.

În **primul capitol** de rezultate originale, am detaliat un studiu pe un grup de pacienţi cu hiperlipidemie şi/sau hiperglicemie şi ne-am propus să evaluăm asocierea unui set de molecule de microARN din circulaţia sangvină cu hiperlipidemia şi/sau hiperglicemia. Studiul a cuprins 30 subiecţi recrutaţi din populaţia generală din Bucureşti, Romania, împărţiţi în patru grupuri: subiecţi sănătoşi (C), pacienţi cu hiperlipidemie (HL), pacienţi cu hiperglicemie (HG) şi hiperlipidemici-hiperglicemici (HLG), în funcţie de nivelurile serice de lipide şi glucoză *à jeun*.

Exista kituri comerciale pentru analiza distribuţiei microARN în celule, ţesuturi sau lichide biologice, ce utilizează amorse specifice pentru detectarea anumitor microARN implicaţi în diferite patologii (boli cardiovasculare, diabet, cancer etc.). Deoarece nu există un kit comercial specific care să conţină un set de miRNA pentru metabolismul lipidic şi al glucozei, am utilizat un PCR array specific pentru miRNA implicaţi în CVD (*Pathway-focused Human Cardiovascular Disease*) pentru determinarea profilului miRNA în seruri de la pacienţi hiperlipidemici (HL) şi/sau hiperglicemici (HLG). Selecţia miRNA pentru analiza individuală s-a bazat pe mărimea creşterii nivelului seric detectată în urma analizei profilului miRNA în ser şi pe datele disponibile în literatură. Astfel, am selectat şi analizat individual un set de opt miRNA (miR-122, miR-125a, miR-486, miR-92a, miR-146a, miR-10a, miR-21 şi miR-33a) în seruri de la pacienţi şi de la subiecţi sănătoşi.

Mai departe, am analizat corelaţiile dintre nivelurile miRNA selectaţi şi unii parametri lipidici şi inflamatori serici. Pentru a determina distribuţia acestor miRNA în clasele de lipoproteine, am izolat lipoproteine de joasă densitate (LDL) şi lipoproteine de înaltă densitate (HDL) din seruri hiperlipidemice şi/sau hiperglicemice şi am identificat prezenţa miRNA selectaţi.

Rezultatele arată că profilul miRNA din serurile HLG prezintă niveluri crescute de miR-122, miR-125a, miR-486 şi miR-92a. De asemenea, nivelurile miR-122, miR-125a, miR-146a, miR-10a, miR-21 şi miR-33a măsurate individual sunt crescute în serurile HL şi se corelează pozitiv cu principalii parametri lipidici şi inflamatori, în timp ce miR-92a şi miR-486 sunt crescuţi doar în serurile de la pacienţi HG. Toţi miRNA selectaţi sunt prezenţi predominant în HDL, doar miR-33a se regăseşte în cantităţi similare atât în HDL, cât şi în LDL. În plus, toţi miRNA analizaţi au niveluri crescute în HDL izolate din seruri hiperlipidemice (HL şi HLG).

Până la ora actuală, aceasta este primul studiu care identifică niveluri cuantificabile de miR-33a în LDL. Până la publicarea acestor rezultate (în *Molecular Biology Reports* şi *Annals of the Romanian Society of Cell Biology*), nu existau date în literatură care să descrie distribuţia miR-125a şi miR-10a circulanţi în serurile pacienţilor hiperlipidemici şi/sau hiperglicemici.

Aceste date originale au fost publicate în ***Molecular Biology Reports*** (revistă indexată ISI cu factor de impact 1,828, având în prezent **13 citări**) şi în ***Annals of the Romanian Society of Cell Biology*** (revistă indexată BDI, având în prezent **1 citare**) şi au fost comunicate la două manifestări ştiinţifice cu participare internaţională sub forma unei **comunicări orale** şi a unui **poster**.

Cel de-**al doilea capitol** de rezultate originale prezintă de asemenea un studiu clinic în care ne-am propus să identificăm miRNA din circulaţia sangvină asociaţi cu diferite subclase de lipoproteine izolate din serurile unor pacienţi în diferite stadii ale CAD: pacienţi cu angină stabilă (SA), pacienţi cu angină instabilă (UA) şi pacienţi la o lună după un infarct miocardic acut (MI) comparativ cu un grup de subiecţi sănătoşi. Grupul SA a fost considerat categorie CAD de referinţă, iar grupurile UA şi MI împreună au fost considerate ca grupuri de CAD vulnerabilă (categorie de risc). Toţi pacienţii au fost recrutaţi de la Clinica de Cardiologie a Spitalului Universitar de Urgenţă Elias, Bucureşti. Subiecţii control au fost donatori sănătoşi de la Centrul de Transfuzie Sangvină, Bucureşti, fără factori de risc cardiovascular sau alte boli în evidenţă (conform istoricului medical, examinării clinice şi testelor de laborator).

Un scop adiţional a fost determinarea miRNA specifici care, împreună cu un set de parametri lipidici cunoscuţi, sunt capabili să prezică vulnerabilitatea pacientului CAD. În acest scop, am izolat lipoproteine de densitate intermediară (IDL), LDL şi HDL din seruri de la pacienţi CAD şi am investigat prezenţa miRNA şi distribuţia lor în subclasele specifice de lipoproteine.

Date publicate anterior arată rolul miRNA în evoluţia CVD şi importanţa utilizării lor ca instrumente de diagnostic [28]. Până la ora actuală, puţine studii au investigat asocierea miRNA cu lipoproteinele circulante şi implicarea lor în evoluţia CAD [18, 24, 29].

Datele obţinute în acest studiu arată că miR-486, miR-92a, miR-122 au cele mai mari niveluri în serurile pacienţilor CAD versus serurile subiecţilor control, dar nivelurile lor serice individuale nu diferă din punct de vedere statistic între grupurile CAD. Nivelurile miR-486 şi miR-92a considerate împreună cu nivelurile de HDL-C, apolipoproteine şi cu activitatea PON1 pot discrimina între pacienţii CAD stabili şi cei vulnerabili, cu un nivel de predicţie de circa 85%.

Datele noastre arată că toţi miRNA selectaţi sunt asociaţi în principal cu HDL, fiind în acord şi extinzând studii ale altor grupuri, recent publicate [15, 18]. Astfel, miR-486, miR-92a, miR-122, miR-125a şi miR-146a sunt asociaţi în principal cu HDL serice şi de zece ori mai puţin cu IDL şi LDL. În plus, miR-486 şi miR-92a au cele mai mari niveluri în HDL izolate de la pacienţi CAD vulnerabili (UA şi MI) versus SA şi distribuţia lor diferă între subfracţiile de HDL, miR-486 predominând în HDL_2, în timp ce miR-92a predomină în HDL_3.

Experimentele noastre arată o distribuţie preferenţială a miRNA în subpopulaţiile HDL (HDL_2 şi HDL_3), nivelurile de miR-486 şi miR-92a putând discrimina între pacienţii CAD stabili şi vulnerabili. Astfel, rezultatele noastre arată o creştere specifică a nivelurilor miR-486 în HDL_2 şi a miR-92a în HDL_3, în special în cele izolate din serurile pacienţilor CAD vulnerabili (pacienţii UA şi MI) comparativ cu pacienţi SA. Aceste date sunt mai departe confirmate de rezultatele care arată că nivelurile serice ale miR-486 şi miR-92a pot estima riscul de CAD vulnerabilă într-un model de regresie logistică binară corectat pentru nivelurile serice de lipide, apolipoproteine şi activitatea enzimelor asociate cu HDL.

Aceste date originale au fost publicate în ***PLoS ONE*** (revistă indexată ISI cu factor de impact 2,806, având în prezent **15 citări**) şi au fost comunicate la 9 manifestări ştiinţifice internaţionale sub forma a **3 comunicări orale** şi **7 postere** şi la 1 manifestare ştiinţifică naţională sub formă de **poster**. Rezumatele a 5 postere au fost publicate în 4 reviste indexate ISI (*FEBS Journal*, *European Heart Journal*, *Cardiovascular Research x2*) şi 1 revistă BDI (*Romanian Journal of Cardiology*).

În cel de-**al treilea capitol** de rezultate originale, am evaluat nivelurile a şase miRNA (miR-223, miR-92a, miR-486, miR-122, miR-125a şi miR-146a) în seruri şi HDL de la pacienţi cu SA, pacienţi cu ACS şi subiecţi sănătoşi. Toţi pacienţii CAD au fost recrutaţi de la Clinica de Cardiologie a Spitalului Universitar de Urgenţă Elias, Bucureşti, iar subiecţii control au fost donatori sănătoşi recrutaţi din personalul Institutului de Biologie şi Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” şi al Spitalului Elias, neavând boli cardiovasculare în antecedente sau alte afecţiuni cunoscute.

Este general acceptat că hiperglicemia este un factor accelerant în evoluţia CAD [30], de aceea am urmărit să investigăm efectul concentraţiilor crescute de glucoză asupra macrofagelor umane în cultură, mai exact asupra expresiei genice a proteinelor maşinăriei de procesare a miRNA (Dicer, Drosha, DGCR8) şi asupra producţiei miRNA analizaţi.

Datele obţinute în acest studiu privind efectul hiperglicemiei asupra miRNA arată că în serurile ACS hiperglicemice, nivelurile miR-223, miR-92a, miR-486, miR-122, miR-125a şi miR-146a sunt crescute comparativ cu serurile ACS normoglicemice. De asemenea, efectul hiperglicemiei se observă şi asupra lipoproteinelor, în HDL izolate din seruri ACS hiperglicemice, nivelurile miR-223, miR-92a şi miR-486 sunt crescute comparativ cu seruri normoglicemice şi sunt semnificativ diferite între pacienţii ACS şi SA.

În studiul nostru, corelaţiile parametrice arată că miR-92a şi miR-486 se corelează negativ cu doi factori de risc pentru CAD: LDL mici şi dense (exprimate ca raportul LDL-C/apoB-100) şi HDL disfuncţional (exprimat ca raportul activitatea PON1/apoA-I). Aceasta sugerează că atunci când LDL mici şi dense şi HDL disfuncţional coexistă, nivelurile miR-92a şi miR-486 cresc, completând rezultatele noastre anterioare care arată o asociere preferenţială a miR-92a şi miR-486 la pacienţii CAD vulnerabili. De asemenea, analiza logistică a parametrilor specifici ai pacienţilor a arătat că nivelurile serice de miRNA (în special miR-92a şi miR-486), împreună cu obezitatea, hipertensiunea, hiperglicemia şi disfuncţionalitatea HDL, au potenţialul de a prezice riscul de producere a unor evenimente cardiovasculare la pacienţi CAD.

În acest capitol arătăm, de asemenea, că în macrofage umane expuse în cultură la seruri izolate de la pacienţi normoglicemici, serurile ACS induc creşterea expresiei genice a Drosha, DGCR8 şi Dicer (proteine implicate în biogeneza miRNA) şi a producţiei miR-223, miR-92a, miR-486, miR-125a şi miR-146a comparativ cu serurile SA, iar concentraţiile crescute de glucoză potenţează efectele observate, mai ales în cazul serurilor ACS. Din informaţiile pe care le avem până la acest moment, acesta este primul studiu care evaluează efectele serurilor de la pacienţi CAD asupra expresiei miRNA şi a componentelor maşinăriei de procesare a acestora în macrofage umane.

Adăugarea glucozei în serurile normoglicemice (pentru a mima concentraţiile crescute existente în serurile hiperglicemice) induce o creştere atât a nivelurilor intracelulare de miRNA (miR-125a, miR-486, miR-92a, miR-146a, miR-223), cât şi a expresiei unor proteine din maşinăria de procesare a miRNA (Drosha, DGCR8 şi Dicer).

Din informaţiile pe care le avem până la acest moment, acestea sunt primele date care arată efectul concentraţiilor crescute de glucoză asupra producţiei miRNA în macrofage umane. Creşterea producţiei miRNA observată în macrofage în cultura este în acord cu nivelurile crescute ale miRNA specifice în seruri.

Aceste date originale au fost publicate în ***PLoS ONE*** (revistă indexată ISI cu factor de impact 2,806, având în prezent **3 citări**) şi au fost comunicate la 3 manifestări ştiinţifice internaţionale sub forma a **2 postere** şi la 1 manifestare ştiinţifică naţională sub formă de **poster**. Rezumatul unui poster a fost publicat în o revistă indexată ISI (*Atherosclerosis*).

În urma rezultatelor obţinute în studiile cu pacienţi şi prin experimentele *in vitro* utilizând macrofage umane în cultură, se pot contura următoarele **concluzii generale**:

1. Nivelurile miR-122, miR-125a, miR-486, miR-92a, miR-146a, miR-10a, miR-21 şi miR-33a circulanţi sunt corelate cu lipidele serice, cu nivelurile de CRP şi IL-1β în serurile pacienţilor hiperlipidemici şi/sau hiperglicemici.
2. Nivelurile miR-125a şi miR-146a circulanţi sunt asociate cu hiperglicemia serică.
3. MiR-122, miR-125a, miR-486, miR-92a, miR-146a, miR-10a şi miR-21 circulanţi sunt asociaţi în principal cu HDL, iar miR-33a este asociat şi cu LDL.
4. Nivelurile serice ale miR-486 şi miR-92a împreună cu nivelurile apoA-I, apoE, cu activitatea PON1 şi cu raportul HDL-C/LDL-C (într-un model de regresie logistică binară) pot fi utilizaţi ca markeri adiţionali pentru diagnosticul CAD vulnerabilă.
5. MiR-486 şi miR-92a se asociază preferenţial cu subpopulaţiile HDL (miR-486 cu HDL_2 şi miR-92a cu HDL_3) şi nivelurile lor discriminează între pacienţii CAD vulnerabili (UA şi MI) şi cei cu angină stabilă.
6. Concentraţiile serice crescute de glucoză se corelează cu nivelurile crescute de miR-223, miR-92a, miR-486 în seruri şi HDL izolate de la pacienţi CAD, aceşti miRNA asociaţi cu HDL fiind capabili să discrimineze între pacienţii ACS şi SA.
7. Expunerea macrofagelor umane în cultură la seruri ACS comparativ cu seruri SA determină creşterea producţiei intracelulare a miR-223, miR-92a, miR-486, miR-125a şi miR-146a prin creşterea expresiei Drosha, DGCR8 şi Dicer, acest efect fiind augmentat de creşterea concentraţiei de glucoză.

Perspective:

Pe baza rezultatelor originale obţinute în cadrul tezei de doctorat, dorim să continuăm studiul microARN prin investigarea funcţionalităţii miR-486 şi miR-92a, utilizând metode *in silico*, *in vitro* şi *in vivo*. Astfel, vom determina genele ţintă ale miR-486 şi miR-92a prin bioinformatică, vom testa ţintirea directă de către mimici ai miRNA a genelor inserate în plasmide şi vom evalua efectele terapiei cu inhibitori pentru miRNA la hamsterul hiperlipidemic.

De asemenea, dorim să analizăm distribuţia microARN în fragmente vasculare recoltate de la pacienţi cu boli cardiovasculare şi să o corelăm cu nivelurile lor circulante şi cu gravitatea bolii.

BIBLIOGRAFIE

[1] P. Libby, Y. Okamoto, V.Z. Rocha, E. Folco, Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice, Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society, 74 (2010) 213-220.

[2] G.K. Hansson, A. Hermansson, The immune system in atherosclerosis, Nat Immunol, 12 (2011) 204-212.

[3] Z. Reiner, A.L. Catapano, G. De Backer, I. Graham, M.R. Taskinen, O. Wiklund, S. Agewall, E. Alegria, M.J. Chapman, P. Durrington, S. Erdine, J. Halcox, R. Hobbs, J. Kjekshus, P.P. Filardi, G. Riccardi, R.F. Storey, D. Wood, ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS), Eur Heart J, 32 (2011) 1769-1818.

[4] I. Manduteanu, M. Simionescu, Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders?, Journal of cellular and molecular medicine, 16 (2012) 1978-1990.

[5] A.J. Lusis, Atherosclerosis, Nature, 407 (2000) 233-241.

[6] M. Simionescu, D. Popov, A. Sima, Endothelial transcytosis in health and disease, Cell Tissue Res, 335 (2009) 27-40.

[7] D.P. Bartel, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, Cell, 116 (2004) 281-297.

[8] K. Ono, Y. Kuwabara, J. Han, MicroRNAs and cardiovascular diseases, FEBS J, 278 (2011) 1619-1633.

[9] K.J. Moore, K.J. Rayner, Y. Suarez, C. Fernandez-Hernando, microRNAs and cholesterol metabolism, Trends in endocrinology and metabolism: TEM, 21 (2010) 699-706.

[10] B.N. Davis, A. Hata, Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms, Cell Commun Signal, 7 (2009) 18.

[11] Y. Lee, C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, V.N. Kim, The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing, Nature, 425 (2003) 415-419.

[12] A.M. Denli, B.B. Tops, R.H. Plasterk, R.F. Ketting, G.J. Hannon, Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex, Nature, 432 (2004) 231-235.

[13] R. Yi, Y. Qin, I.G. Macara, B.R. Cullen, Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs, Genes Dev, 17 (2003) 3011-3016.

[14] P. Graves, Y. Zeng, Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view, Genomics Proteomics Bioinformatics, 10 (2012) 239-245.

[15] K.C. Vickers, B.T. Palmisano, B.M. Shoucri, R.D. Shamburek, A.T. Remaley, MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins, Nat Cell Biol, 13 (2011) 423-433.

[16] D.L. Michell, K.C. Vickers, Lipoprotein carriers of microRNAs, Biochim Biophys Acta, (2016).

[17] R.A. Boon, K.C. Vickers, Intercellular transport of microRNAs, Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 33 (2013) 186-192.

[18] J. Wagner, M. Riwanto, C. Besler, A. Knau, S. Fichtlscherer, T. Roxe, A.M. Zeiher, U. Landmesser, S. Dimmeler, Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs, Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 33 (2013) 1392-1400.

[19] J.T. Mendell, E.N. Olson, MicroRNAs in stress signaling and human disease, Cell, 148 (2012) 1172-1187.

[20] A.M. Ardekani, M.M. Naeini, The Role of MicroRNAs in Human Diseases, Avicenna journal of medical biotechnology, 2 (2010) 161-179.

[21] K.J. Rayner, C. Fernandez-Hernando, K.J. Moore, MicroRNAs regulating lipid metabolism in atherogenesis, Thromb Haemost, 107 (2012) 642-647.

[22] C. Guay, R. Regazzi, Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus, Nat Rev Endocrinol, 9 (2013) 513-521.

[23] J. Madrigal-Matute, N. Rotllan, J.F. Aranda, C. Fernandez-Hernando, MicroRNAs and atherosclerosis, Current atherosclerosis reports, 15 (2013) 322.

[24] E.E. Creemers, A.J. Tijsen, Y.M. Pinto, Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?, Circulation research, 110 (2012) 483-495.

[25] F.J. Ortega, J.M. Mercader, V. Catalan, J.M. Moreno-Navarrete, N. Pueyo, M. Sabater, J. Gomez-Ambrosi, R. Anglada, J.A. Fernandez-Formoso, W. Ricart, G. Fruhbeck, J.M. Fernandez-Real, Targeting the circulating microRNA signature of obesity, Clinical chemistry, 59 (2013) 781-792.

[26] M. Parrizas, A. Novials, Circulating microRNAs as biomarkers for metabolic disease, Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism, 30 (2016) 591-601.

[27] D. Santovito, V. Egea, C. Weber, Small but smart: MicroRNAs orchestrate atherosclerosis development and progression, Biochimica et biophysica acta, 1861 (2016) 2075-2086.

[28] M. Jaguszewski, J. Osipova, J.R. Ghadri, L.C. Napp, C. Widera, J. Franke, M. Fijalkowski, R. Nowak, M. Fijalkowska, I. Volkmann, H.A. Katus, K.C. Wollert, J. Bauersachs, P. Erne, T.F. Luscher, T. Thum, C. Templin, A signature of circulating microRNAs differentiates takotsubo cardiomyopathy from acute myocardial infarction, European heart journal, 35 (2014) 999-1006.

[29] V.P. van Empel, L.J. De Windt, P.A. da Costa Martins, Circulating miRNAs: reflecting or affecting cardiovascular disease?, Curr Hypertens Rep, 14 (2012) 498-509.

[30] A.P. Ofstad, Myocardial dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes, Scand J Clin Lab Invest, 76 (2016) 271-281.

Institute of Cellular Biology and Pathology
"Nicolae Simionescu"
8, B.P. Hasdeu Street, POB 35 – 14, Bucharest, Romania
Phone: (+4021) 319.45.18; 319.45.20; www.icbp.ro

RULES OF ORGANISATION AND OPERATION

„NICOLAE SIMIONESCU" INSTITUTE OF CELL BIOLOGY AND PATHOLOGY ROMANIAN ACADEMY

CHAPTER I
General framework.....3

CHAPTER II
Subject matter.....4

CHAPTER III
Organisation of the Institute of Cell Biology and Pathology "Nicolae Simionescu".....4

CHAPTER IV
Final provisions.....9

CHAPTER I
General Framework

Article 1
The Institute of Cell Biology and Pathology was established on the 15th of April 1978, according to Decree no.152; from its establishment until 1990 the Institute was under the Ministry of Education and Training, after which it became part of the Romanian Academy.
The official name of the Institute is: Institute of Cell Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" (hereafter, ICBP "NS").

Article 2
(1) ICBP "NS" is a Romanian legal entity of public interest and operates in accordance with the regulations governing the activity of the research institutes of the Romanian Academy (the tutelary forum), as well as its own regulations adopted within the limits conferred by law.

(2) ICBP "NS" is coordinated by the Biological Sciences Section of the Romanian Academy, and the economic-financial activity is coordinated and controlled by the administrative apparatus of the Romanian Academy, according to the Statute of the Romanian Academy, art. 43, para. 1-5.

Art. 3
(1) ICBP "NS" has its headquarters in Romania, Bucharest, 8 B.P. Hasdeu Street, sector 5, postal code 050568. In the individual land register no. 47925 of the Municipality of Bucharest, sector 5, ICBP "NS" has cadastral no. 14962.

Art. 4
(1) ICBP "NS" administers the funds received from the state budget, through the guardian body, the Romanian Academy, under the conditions of the law.

(2) The own income from contracts with funding from research projects and other contracts with various beneficiaries are administered in compliance with the legal provisions in force and in accordance with the Statute of the Romanian Academy, art. 43, para. 4, with the approval of the Director and/or the Scientific Council, as the case may be.

CHAPTER II
Subject matter

Art. 5 ICBP "NS" has the following objectives:
a. Basic biomedical research and transfer of results to the clinic;
b. to ensure the specialisation and further training of researchers in the field of cell biology and pathology, through post-graduate courses, specialisation traineeships, doctoral and other forms;
c. supporting the teaching process in the disciplines of cell biology and pathology in which students of the faculties of biology, medicine, pharmacy, chemistry, physics, etc. are trained.
d. promotion of modern cell biology and pathology in Romania;
e. to increase international scientific exchanges

Art. 6 Research is carried out within the framework of research programmes and projects approved by the Scientific Council and approved by the Biological Sciences Section of the Romanian Academy, in accordance with the provisions of the Statute of the Romanian Academy, art. 15, para. 5, as well as on the basis of contracts with public partners interested in the research of processes within the scope of activity of the Institute.
Art. 7 Within the framework of its activity, ICBP "NS" collaborates with research institutes, higher education institutions and other units interested in scientific research and application of results in the field of cell biology and pathology. The Institute also collaborates, on the basis of agreements and understandings, with specialized institutions abroad, with international bodies in the field, as well as with prestigious scientific personalities in the field.

CHAPTER III

Organisation of the "Nicolae Simionescu" Institute of Cell Biology and Pathology

Art.8 The organisational structure of the ICBP "NS" comprises the following hierarchical levels:

Scientific Council

Director

Deputy Director,

Scientific Secretary

Research Department

Administrative department

Art. 9 The organisational structure of the ICBP "NS" comprises

A) Research Compartment which includes the departments and laboratories:

1. LIPIDOMICS Department
2. PROTEOMICS Department
3. Department of PATHOPHYSIOLOGY AND CELL PHARMACOLOGY
4. Department of BIOPATOLOGY AND THERAPY OF INFLAMMATION
5. Department of FUNCTIONAL GENOMICS
6. Department of GENE REGULATION AND MOLECULAR THERAPY
7. Department of STEM CELL BIOPATOLOGY,
8. Department of CELL AND TISSUE ENGINEERING and EXPERIMENTAL MODELING PLATFORM

B) Economic-Administrative Department comprising:

1. Human Resources Department, Financial-Accounting Department, Secretariat, Library, Central Store;
2. Technical Service which includes the Technical Administrative Department and the Protection and Security Department;
3. Procurement Department

Art. 10 Powers of the management by hierarchical levels: Scientific Council

(1) The Scientific Council is the scientific management structure of the ICBP "NS", appointed according to art. 46 and 47 of the Statute of the Romanian Academy.

(2) The Scientific Council consists of the President (Director of the Institute), the Deputy Scientific Director, the Scientific Secretary and a number of members. The members of the Romanian Academy working in the Institute, the Deputy Director, the Scientific Secretary and the persons in charge of the research departments/laboratories are ex officio members of the Scientific Council.

(3) The Scientific Council has mainly the following tasks:

3.1 it carries out its activity according to Art. 47 of the Statute of the Romanian Academy and the laws in force;

3.2 it analyzes and approves the research works carried out in the Institute, presenting, when necessary, improvement measures;

3.3 approves the results of the competitions for filling positions in the Institute and submits them for approval to the Biological Sciences Section of the Romanian Academy;

3.4 to set the dates and themes of the scientific sessions organised by ICBP "NS";

3.5 approves/approves the documents elaborated within the PhD, according to the SCOSAAR (School of Advanced Studies of the Romanian Academy) regulations

3.6 annually reviews and approves the continuation of the activity of the scientific researchers I who wish to continue working in the institute after reaching retirement age;

3.7 ensures the regular holding of scientific seminars and progress reports on research topics;

3.8 prepares the documents requested by the Romanian Academy;

3.9 together with the Ethics Committee, supervises the observance of ethical rules by the researchers of the ICBP "NS";

3.10 decides on the participation of researchers from the Institute in congresses, round tables, conferences, courses abroad;

3.11 takes all necessary measures for the good organization and safe conduct of the activity, for the permanent supervision of the equipment and installations, of all the rules of operation, maintenance, repairs, maintenance of order and discipline, organization of the systematic control of the duties of the employees and holding accountable those who violate the obligations of the service;

3.12 take measures to improve working conditions, ensure the conditions of work protection and compliance with the health and hygiene rules according to the legislation in force;

3.13 establishes individual performance objectives and the criteria for evaluating their achievement;
3.14 performs any other tasks related to the scientific activity of the ICBP "NS".
The proceedings of the meetings of the Scientific Council shall be recorded in the relevant minutes.

Art. 11 Duties of the management by hierarchical levels: Director
(1) represent the ICBP "NS" in its relations with other institutions in the country and abroad;
(2) is a tertiary authorising officer, according to the law;
(3) elaborates in collaboration with the Deputy Director, the Scientific Secretary and the heads of scientific departments the scientific research plan of the Institute, submits it to the Scientific Council for discussion and approval by the Biological Sciences Section of the Romanian Academy;
(4) ensures the scientific coordination of the activity of the research departments/laboratories, organizes and controls the activity of the Institute in order to ensure the optimal realization of the research plan;
(5) to ensure the publication and exploitation of scientific research results;
(6) performs the duties incumbent upon him/her and is responsible for the entire activity of the ICBP "NS", according to the law and art. 45 of the Statute of the Romanian Academy.

Art. 12 Duties of the management on hierarchical levels: Deputy Director
(1) shall be appointed by competition for a period of 4 years, according to the provisions of art. 44 para. 1 of the Statute of the Romanian Academy and Law 319/2003. He/she is subordinate to the Director;
(2) The duties of the Deputy Scientific Director are the following:
a.support the Director of the ICBP "NS" in the performance of all his/her duties;
b.to coordinate the elaboration of draft research programmes, monitoring their implementation;
c. to guide and supervise the realization of the scientific events of the ICBP "NS", supporting the Director in ensuring the relations of the ICBP "NS" with other institutions in the country and abroad;
d. to ensure the effective exploitation of the results of scientific research and the collaboration of the ICBP "NS" with other institutions;
e. to follow up the implementation of ICBP "NS" research contracts;
f. to carry out other management activities based on the delegation of tasks, powers and responsibilities by the Director of the ICBP "NS".

Art. 13 Monitoring Commission

(1) In order to monitor, coordinate and methodologically guide the implementation and development of the internal managerial control system, the Director of ICBP "NS"constitutes, by internal decision act, a structure with attributions in this sense, called the Monitoring Commission.

(2) The Monitoring Commission includes the Coordinators of the departments/laboratories included in the first management level of the organizational structure of ICBP"NS", with the exception of the internal public audit department.

(3) The Monitoring Commission is coordinated by a President, who can be the head of the entity or another person with authority, delegated by him and assisted by a technical secretariat.

(4) The way of organization and work of the Monitoring Commission is under the responsibility of its President and is established according to the volume and complexity of the processes and activities, based on the Commission's Organization and Operation Regulation, which is updated whenever is the case.

(5) The President of the Monitoring Commission ensures the management of the meetings, according to the agenda, and approves the minutes of the meetings and, as the case may be, their decisions. Depending on the theme of the agenda of the meetings, at the request of the President of the Monitoring Commission, other persons may also participate as guests.

(6) The Monitoring Commission coordinates the process of updating the general and specific objectives, the procedural activities, the risk management process, the performance monitoring system, the status of the procedures and the monitoring and reporting system, respectively information to the manager public entity.

Art. 14 Internal Management Control System Development Programme

(1) In order to strengthen a system of managerial internal control, the Monitoring Commission shall draw up the Programme for the Development of the System of Managerial Internal Control, referred to as the Development Programme, which shall be updated annually at the level of the ICBP "NS".

(2) The Development Programme shall include the objectives of the public entity in the field of managerial internal control, according to the stage of its implementation and development, and for each standard of managerial internal control, activities, responsible persons and deadlines, as well as other relevant elements in the implementation and development of the managerial internal control system shall be established.

(3) The Development Programme shall also highlight professional development actions in the field of the system of managerial internal control, both for persons with managerial and executive functions, through courses organised in accordance with the relevant legislative regulations.

Article 15 Risk management

(1) The risk management process shall be under the responsibility of the Chairman of the Monitoring Commission, organised according to the size, complexity and specific environment of the ICBP "NS".
(2) In order to ensure effective risk management at all levels of the ICBP "NS", the coordinators of the compartments/laboratories at the first management level of the organisational structure shall appoint a risk officer at their level.
(3) Risk Officers shall advise the staff of the compartments and assist their managers in the risk management process.
(4) Risks related to objectives and/or activities shall be identified and assessed at the level of each compartment in accordance with the minimum elements of the Risk Register; significant risks shall be centralised at the level of the Monitoring Committee in the Risk Register of the ICBP "NS".
(5) The Monitoring Commission analyses and prioritises significant risks, which may affect the achievement of the objectives of the ICBP "NS", by establishing the risk profile and risk tolerance limit, annually, approved by the management of the ICBP "NS".
(6) The Technical Secretariat of the Monitoring Commission, based on the Risk Register of the ICBP "NS", proposes the risk profile and risk tolerance limit which are reviewed and endorsed in the Commission meeting and approved by the Director of the ICBP "NS",.
(7) The coordinator of the department/laboratory submits the control measures for significant risks to the Technical Secretariat of the Monitoring Commission, which annually draws up the Plan for the implementation of control measures for significant risks at the level of the ICBP "NS"; the plan is reviewed by the Monitoring Commission and approved by the Director of the ICBP "NS".
(8) The Technical Secretariat of the Monitoring Commission forwards the approved Plan of Measures to the departments responsible for significant risk management for implementation.
(9) The Technical Secretariat of the Monitoring Commission shall, on the basis of the annual reports of the coordinators of the departments/laboratories at the first management level on the conduct of the risk management and performance monitoring process, prepare a report to the Director of the ICBP "NS", approved by the Chairperson of the Monitoring Commission, on the conduct of the risk management and performance monitoring process at the ICBP "NS".

(10) The briefing shall include an analysis of the risks identified and managed at department/laboratory level and the monitoring of objectives and activities through performance indicators at the level of the ICBP "NS".
(11) The management of the ICBP "NS" shall ensure that documented procedures, i.e. system procedures and operational procedures, for the processes and activities carried out within the CPBC "NS" are developed and communicated to its staff.
(12) In order to ensure the regular, effective, economical and efficient achievement of the objectives of the ICBP "NS", the departments/laboratories shall draw up documented procedures under the coordination of the Monitoring Commission.
(13) The Technical Secretariat of the Monitoring Commission shall review the procedure in terms of compliance with the minimum structure laid down in the Documented Procedure.
(14) Documented procedures shall be signed by the persons responsible for procedural activities when drawn up, by the department/laboratory coordinator when checked, by the Chairman of the Monitoring Commission when endorsed and approved by the Director of the ICBP "NS" or, where appropriate, in accordance with the procedure laid down at ICBP "NS" level.
(15) Depending on the specifics and complexity of ICBP "NS" activities, including internal regulations, ICBP "NS" customizes its procedures in accordance with its own system procedure, necessarily based on the minimum structure provided for in the Documented Procedure.

Art. 16 The attributions of management by hierarchical levels: the Scientific Secretary

(1) is appointed through competition for a period of 4 years, in relation to the provisions of art. 44 para. 1 of the Statute of the Romanian Academy and of Law 319/2003. He is subordinate to the Director of ICBP "NS";
(2) The Scientific Secretary has the following duties:
a. provides administrative services collateral to the doctoral studies carried out by ICBP "NS", the direct sub-coordination of the Director of ICBP "NS", with the approval of SCOSAAR and the Department of Life, Medical and Agricultural Sciences of SCOSAAR;
b. is responsible for the effective implementation of the scientific events organized by ICBP "NS";
c. elaborates the activity reports of the ICBP "NS", participating in the finalization, together with the Director, of the research program projects;
d. supports the Director in coordinating the editorial teams of the ICBP "NS" publications, when they are produced;
e. pursues the effective realization of the valorization of scientific research from ICBP "NS";

f. ensure the creation of the database of the Scientific Council of ICBP "NS".

Art. 17 Attributions of management by hierarchical levels: Chief Accountant

(1) He is appointed through competition and is appointed by the Director, under the conditions of Law 82/1991 - the updated Accounting Law. He is subordinate to the ICBP Director "NS".
(2) It mainly has the following attributions:
a. elaborates the project of the income and expenses budget, following, after approval, its quarterly and annual implementation;
b. manages, organizes and carries out the financial management and accounting activities, following the compliance with the legislation in force;
c. ensures the management and management of the patrimony of ICBP"NS";
d. monitors the progress of collection operations, according to the laws in force;
e. ensures the management, according to laws and contracts, of extrabudgetary revenues;
f. provide other tasks according to the Director's decisions;
g. the position of Chief Accountant is held in relation to the provisions of Law 82/1991 - the updated Accounting Law, by a graduate with higher economic studies.

Art. 18 The attributions of management on hierarchical levels: Head of the Technical Service
(1) He is appointed through competition and is appointed by the Director, according to the legislation in force. He is subordinate to the Deputy Director of ICBP "NS".
(2) It mainly has the following attributions:
a. organizes, coordinates and controls the activity of the Technical Service;
b. elaborates and proposes for approval the ICBP "NS" policies regarding the technical-administrative activity;
c. elaborates the project of the procurement plan for the Technical Service;
d. coordinates the timely commissioning of the newly purchased equipment;
e. executes any other provisions given by the Director in achieving the short, medium and long term strategies of ICBP "NS", within the limits of compliance with the legal basis.
Art. 19 Attributions of heads of organizational structures: Department/Laboratory Coordinator
(1) Ensures the coordination of a research department/laboratory for the realization of projects related to field-specific research programs, having the following attributions:
a. elaborates the projects of the research programs, monitors the realization of the research works included in the research program of ICBP "NS", ensuring the overall coordination of their content;
b. supports and guides researchers in their professional specialization, in improving the working methodology and in the proper operation of the equipment;
c. supports researchers for the exploitation of their results and for the integration of data in the national and international scientific circuit;
d. prepares the research reports of the department/laboratory;
e. prepares the annual evaluations of researchers in the department/laboratory;
f. carries out other tasks received from the management of ICBP "NS".
(2) The Department/Laboratory coordinator is appointed by the Director, after consulting the Scientific Council.

It is subordinate to the Scientific Council, and through it, to the Director.

Art. 20 In the administrative sector, the head of department/office ensures the smooth functioning of the department/office he leads, coordinates the activity of the subordinate staff, is responsible to the ICBP "NS" management for the activity of the department/office. He is appointed by competition according to the legislation in force and is subordinate to the leadership of ICBP "NS".

Art. 21 Purpose and definition of internal managerial control standards

(1) Internal managerial control standards define a minimum of general management requirements that all public entities must follow.

(2) The purpose of control standards is to create a uniform and coherent internal managerial control model that allows comparisons between entities of the same kind or within the same entity, at different times, and makes it possible to highlight the entity's results and its evolution .

(3) The establishment of the internal managerial control system is the responsibility of the management of each public entity and must be based on the internal control standards promoted by the General Secretariat of the Government, pursuant to the law. Their formulation as general as possible is necessary to enable all managers to apply them, despite the significant differences between different public entities. Internal managerial control systems must be developed taking into account the specific legal, organizational, personnel, financing, etc. of each individual public entity.

(4) The standards are grouped into five components of internal managerial control:

– control environment - groups issues related to organization, human resources management, ethics, deontology and integrity;

– performance and risk management - refers to management issues related to goal setting, planning (multiannual planning), programming (management plan), performance (performance monitoring) and risk management;

– control activities - the standards grouped in this component focus on the elaboration of procedures, continuity of processes and activities, separation of duties, supervision;

– information and communication - in this section are grouped the problems related to the creation of an adequate information system and a system of reports regarding the execution of the management plan, the budget, the use of resources, as well as the management of documents;

- evaluation and audit - the issue covered by this group of standards concerns the development of the capacity to evaluate internal managerial control, in order to ensure the continuity of its improvement process.

(5) Each control standard is structured as follows:

– description of the standard - presents the defining features of the specific domain to which the standard refers, domain fixed by its title;

– general requirements - present the determining directions in which to act in order to comply with the standard;

- main references - specify the representative normative acts, which include regulations applicable to the standard, but not exhaustive.

Art. 22 List of internal managerial control standards at public entities

a) The control environment

– Standard 1 - Ethics and integrity

– Standard 2 - Duties, functions, tasks
– Standard 3 - Competence, performance
– Standard 4 - Organizational structure
b) Performance and risk management
– Standard 5 - Objectives
– Standard 6 - Planning
– Standard 7 - Performance monitoring
– Standard 8 - Risk management
c) Control activities
– Standard 9 - Procedures
– Standard 10 - Supervision
– Standard 11 - Business continuity
d) Information and communication
– Standard 12 - Information and communication
– Standard 13 - Document management
– Standard 14 - Accounting and financial reporting
e) Evaluation and audit
– Standard 15 - Evaluation of the internal managerial control system
– Standard 16 - Internal audit

Standard 1-Ethics and integrity.
(1) The management and employees of ICBP "NS" know and support the ethical values and values, ICBP"NS" respects and applies the regulations regarding ethics, integrity, avoiding conflicts of interest, preventing and reporting fraud, acts of corruption and reporting irregularities .
(2) The management of ICBP "NS" supports and promotes, through its decisions and the power of personal example, ethical values, personal and professional integrity of employees.
3. The leadership of ICBP "NS" adopts a code of conduct, develops and implements policies and procedures regarding integrity, ethical values, avoiding conflicts of interest, preventing and reporting fraud, acts of corruption and reporting irregularities.
4. The leadership of ICBP "NS" facilitates the open communication by employees of their concerns in matters of ethics and integrity, by appointing an ethics advisor to monitor compliance with the rules of conduct at the entity level.
5. The action of reporting irregularities by employees must be transparent and must be seen as the exercise of a professional duty.
6. Employees who report irregularities of which, directly or indirectly, they are aware are protected against any discrimination, and managers have the obligation to undertake appropriate investigations, in order to elucidate what has been reported and to take, if necessary, the necessary measures.
7. The management and employees of ICBP "NS" have a constructive approach to internal managerial control, whose operation they support permanently.
8. The declaration of assets, interests and goods received free of charge is carried out by all concerned factors, in accordance with the legal provisions.

Standard 2- Duties, functions, tasks.

1. The management of ICBP "NS" ensures the preparation and updating of the document regarding the mission of ICBP "NS", internal regulations and job descriptions, which it communicates to employees.
2. The regulation of organization and operation of the ICBP "NS" includes in an integral manner, as the case may be, general regulations, the role and functions of the ICBP "NS", the main attributions, the organizational structure, the functional relations, competences and attributions of the departments/laboratories; the regulation is published on the website of the ICBP "NS", if possible.
3. Each employee must know the mission and vision, the general and specific objectives of ICBP "NS" and of the department/laboratory of which he is a part, his role within the department/laboratory, established by the job description, as well as the duties of the position he occupies .
4. The coordinators of the ICBP "NS" departments/laboratories have the obligation to draw up and update, whenever necessary, job descriptions for subordinate staff.
5. The tasks/assignments of the position must be clearly formulated and closely related to the specific objectives and attributions of the department/laboratory.
6. The coordinators of the ICBP "NS" departments/laboratories must identify the new and/or highly complex tasks assigned to the employees and support them in achieving them, offering them a concrete work vision.
7. The ICBP "NS" coordinator orders the identification of sensitive functions based on risk factors, their centralization at the ICBP "NS" level and the establishment of an appropriate policy for their management by developing measures, so that the negative effects on the activities carried out within the ICBP "NS" should be minimal.

Standard 3- Competence and performance

1. The management of ICBP "NS" ensures that positions are filled by competent persons, to whom they entrust tasks according to their skills, and ensures conditions for improving the professional training of employees.
2. The professional performances of employees are evaluated annually in relation to the objectives of the position.
3. The management of ICBP "NS" and the employees have the knowledge, skills and experience that make it possible to carry out the tasks/assignments efficiently and effectively, as well as the good understanding and fulfillment of the responsibilities related to internal managerial control.
4. The competence of the employees and the entrusted tasks must be in permanent balance, to ensure which the management of ICBP "NS" acts by:

– defining the knowledge and skills required for each job;

- conducting recruitment interviews, based on a predetermined evaluation document;

– identifying professional training needs and establishing professional training requirements in the context of the annual evaluation of employees, as well as tracking their career evolution; the training needs identified are correlated with the results from the individual professional performance evaluation reports/sheets.

5. The professional performances of the employees are evaluated at least once a year in relation to the individual annual objectives and are discussed with them by the evaluator.

6. The managers of ICBP "NS" ensure that each employee participates in professional training courses in his field of competence, according to the legislation in the field.

Standard 4- Organizational structure

1. The director of ICBP "NS" defines the organizational structure, competencies, responsibilities, tasks, organizational relationships and communicates the specific documents of the organizational structure to the employees.
2. The director of ICBP "NS" establishes, in writing, the limits of the powers and responsibilities he delegates, in accordance with legal requirements.
3. The organizational structure must be established in accordance with the mission and purpose of ICBP "NS", so that it supports the decision-making process through an adequate delegation of responsibilities and serves to achieve the established objectives in conditions of efficiency, effectiveness and economy.
4. Pursuant to the normative act on the organization and operation of ICBP "NS", the Director of ICBP "NS" approves the organizational structure: departments/laboratories, general directorates, departments, services, offices, compartments.
5. Staffing with management staff and execution staff of the departments/laboratories can be found in the entity's job description and is carried out in compliance with the concordance between the nature of the positions and the professional and managerial skills necessary to fulfill the tasks of the employees.
6. Competence, responsibility, task and obligation to report are attributes associated with the position; they must be well defined, clear, coherent and reflect the elements considered for achieving the ICBP "NS" objectives.
7. The leadership of ICBP"NS" periodically analyzes the degree of adaptability of the organizational structure to the changes made inside and/or outside ICBP "NS".
8. In ICBP "NS", the delegation of duties is carried out through the organization and operation regulations, job descriptions and through express orders/decisions to carry out certain operations and responsibilities.
9. The delegation is conditioned mainly by the potential and degree of workload of the ICBP "NS" management and the employees involved.
10. The act of delegation of duties and powers is compliant when:
– respects the ratio between the complexity of the delegated tasks/assignments and the knowledge, experience and ability necessary to perform the delegated act of authority;
- the completion deadlines and specific criteria for the successful performance of delegated tasks/assignments are specified in its contents;
– all information on the responsibility that will be entrusted is provided by the Director;
- it is confirmed, by signature, by the employee to whom the tasks/attributions have been delegated.
11. The delegated employee is fully responsible for the performance of the task, and the manager who delegated maintains the final responsibility for its performance in front of his superiors.

Standard 5- Objectives

1. The management of ICBP "NS" defines the general objectives, related to the entity's goals, information reliability, compliance with laws, regulations and internal policies, as well as specific objectives and communicates them, as appropriate, to all employees and interested third parties.

2. The objectives of the ICBP”NS” must be clearly formulated, in a way that allows monitoring their fulfillment and be updated whenever necessary.
3. The management of ICBP”NS” establishes the general objectives so that they are correlated with the mission and goals of ICBP”NS” and with respect to the principles of economy, efficiency and effectiveness.
4. The leadership of ICBP”NS” transposes the general objectives into specific objectives and into expected results for each activity and communicates them to the employees.
5. The specific objectives must be defined in such a way as to respond to the package of "SMART" requirements (specific, measurable, appropriate, realistic, with a deadline).
6. Establishing the objectives is within the competence of the ICBP”NS” management, and the responsibility for their achievement lies with both the management and the employees.
7. The establishment of the objectives is based on the formulation of hypotheses/premises, correlated with the provisions of the normative act on the organization and operation of the ICBP"NS". Performance indicators are attached to specific objectives and activities and are communicated to employees by the Director.
8. The management of ICBP"NS" updates/reevaluates the objectives whenever it notices a change in the assumptions/premises that were the basis for setting them. The management of ICBP”NS” draws up plans or other planning documents that align the activities necessary to achieve all the objectives set with the maximum resources possible to allocate, establish deadlines and responsible persons, so that the risks likely to affect the achievement of ICBP"NS" 's objectives should be minimal.

Standard 6- Planning
1. The management of ICBP”NS” draws up plans or other planning documents that align the activities necessary to achieve all the objectives set with the maximum resources possible to allocate, establish deadlines and responsible persons, so that the risks likely to affect the achievement ICBP”NS” objectives to be minimal.
2. The leadership of ICBP”NS” elaborates, as appropriate, a strategy, strategic plan, etc., in which the general objectives of ICBP”NS”, the priorities and the activities to be carried out in the medium and long term, as well as an annual plan of management or any other specific ICBP”NS” planning document in order to establish the specific objectives, the activities necessary to fulfill them and the necessary resources.
3. The distribution of resources requires informed decisions and analyzes regarding the best way of allocation, given the limited nature of resources.
4. Changing the objectives, resources or other elements of the substantiation process requires updating the planning document.
5. In order to achieve the objectives, the ICBP"NS" Director ensures the coordination of the decisions and actions of the departments/laboratories and organizes prior consultations both within the departments and between them.

Standard 7- Performance monitoring
1. The director of ICBP”NS” orders the performance monitoring for the objectives and/or activities of the departments/laboratories, by means of quantitative and/or qualitative indicators, including regarding economy, efficiency and effectiveness.

2. The coordinators of the departments/laboratories monitor the performances of the activities under coordination, by developing a system adapted to the size and specifics of the department/laboratory's activity. The monitoring of the performance of the carried out activities is carried out at the level of each department/laboratory in order to inform the management of ICBP"NS" regarding the achievement of the proposed objectives.
3. The coordinators of the departments/laboratories ensure that at least one performance indicator is established for the established objectives and the activities provided for in the plan and/or carried out, with the help of which achievements are monitored and reported. Based on the established indicators, the head of the department/laboratory prepares a performance monitoring report annually, which can be included in a larger report, such as an activity report or other reporting document of the public entity.
4. On the basis of the annual performance monitoring reports received from the departments/laboratories, an information regarding performance monitoring at the ICBP"NS" level is drawn up by the Director.
5. The structure and complexity of the performance monitoring system are conditioned by the size and specifics of the ICBP"NS" activity, by the modification of the objectives and/or indicators, by the employees' access to information.
6. The management of ICBP"NS" orders the periodic evaluation of performances, ascertains possible deviations from the objectives and takes the necessary preventive and corrective measures.

Standard 8- Risk management
1. The Director of ICBP"NS" organizes and implements a risk management process to facilitate the achievement of its objectives in terms of economy, efficiency and effectiveness.
2. ICBP"NS" defines its own risk management process adapted to the size, complexity and specific environment, in order to identify all possible sources of risk and to reduce or eliminate the probability and impact of risks.
3. The management of ICBP"NS" determines the vulnerabilities and threats related to the objectives and activities, which may affect their achievement.
4. The director of ICBP"NS" has the obligation to organize and implement an effective risk management process, mainly through:
a) the identification of risks in close connection with the activities within the specific objectives, the achievement of which could be affected by the materialization of the risks; the identification of threats/vulnerabilities present within the current activities of the entity that could lead to the failure to achieve the proposed objectives and to the commission of acts of corruption and fraud;
b) risk assessment, by estimating the probability of materialization, of the impact on the activities within the objectives if they materialize; ranking and prioritizing risks according to risk tolerance;
c) establishing the risk management strategy (risk response) by identifying the most appropriate ways to treat risks, including control measures; risk analysis and management according to the risk tolerance limit approved by the entity's management;
d) monitoring the implementation of control measures and reviewing them according to the effectiveness of their results;
e) periodic reporting of the risk situation is carried out whenever necessary or at least once a year, respectively if the risks persist, depending on the appearance of new risks, the effectiveness of the control measures adopted, the reassessment of existing risks, etc.

5. The coordinators of the departments/laboratories included in the first management level of the organizational structure of ICBP”NS” nominate those responsible for risks and ensure the organizational and procedural framework for the identification and assessment of risks, the establishment of the risk management strategy, the monitoring of the implementation of control measures, the review and their periodic reporting.
6. All activities and actions initiated and implemented within the risk management process are rigorously documented, and the synthesis of data, information and decisions made in this process is included in the Risk Register, a document that certifies that within the public entity there is a risk management process and that it works; The register of risks per entity includes only the significant risks.
7. Those responsible for the risks within the departments/laboratories collect the risks related to the activities, identify the risk strategy, draw up the Risk Register at the department level.
departments/laboratories from the first management level, propose control measures and monitor their implementation, after they have been previously approved by the department/laboratory coordinator.
8. Risks are updated at the level of departments/laboratories whenever this is required, but mandatory annually, by completing the changes in the Risk Register. ICBP”NS”, according to an internal procedure and the experience gained in risk management, can use a series of tools specific to the identification and tracking of risks, such as a risk alert form, a risk tracking sheet, etc., without them having a character mandatory.
9. The control measures established by the departments/laboratories are centralized at the ICBP”NS” level and are approved by the ICBP”NS” Director. Control measures are mandatory for the management of significant risks at departmental/laboratory level and are updated whenever necessary.
10. The coordinators of the departments/laboratories in the first management level report annually on the progress of the risk management process, which mainly includes the total number of risks managed at the level of the departments/laboratories, the number of treated and unresolved risks by the end of the year, the stage of implementation of the measures control and possible revisions of the risk assessment, in compliance with the risk tolerance limit approved by the ICBP”NS” management.
11. On the basis of the annual reports received from the departments/laboratories, an information regarding the implementation of the risk management process at the ICBP”NS” level is elaborated; the information is analyzed and approved in the Monitoring Commission, after which it is presented to the ICBP"NS" Director.

Standard 9-Procedures
1. The director of ICBP”NS” ensures the development of documented procedures in a unitary manner for major processes or significant activities carried out within the entity and brings them to the attention of the staff involved.
2. The management of ICBP”NS” ensures that for the processes and activities, declared procedural, there is adequate documentation and that the operations are recorded in documented procedures.
3. In order for the procedures to become effective internal control tools, they must:
– to be specified in written documents (documented procedures);
– refer to all important processes and activities;

– to ensure a correct separation of the functions of initiating, verifying, approving and approving operations;
– to be simple, complete, precise and adapted to the processes and procedural activity;
– to be constantly updated;
- to be brought to the attention of the personnel involved.
4. The documented procedures developed must be in accordance with the structure provided in annex no. 2 of Order 600/2018 and/or with a system procedure regarding the elaboration of procedures at the level of the public entity.
5. The procedures must ensure a separation of the functions of initiating, carrying out, verifying, approving and approving the operations, so that they are entrusted to different people. In this way, the risk of errors, frauds, violations of legislation, as well as the risk of not detecting problems in the flow of a process or an activity is considerably reduced.
6. Managers of public entities in which, due to the small number of employees, the possibility of applying the separation of duties and responsibilities is limited must be aware of the occurrence of the previously mentioned risks and compensate for this limitation through additional control measures implemented on the flow of processes or activities procedural.
7. In ICBP”NS”, access to resources, as well as their protection and correct use, are regulated by administrative documents, which are brought to the attention of employees. Restricting access to resources reduces the risk of their inappropriate use.
8. The management of ICBP”NS” ensures that, for all situations in which, due to special circumstances, deviations from established policies or procedures occur, appropriate documents, approved at an appropriate level, are drawn up before the operations are carried out. The circumstances and the way of managing situations of deviation from the existing policies and procedures are periodically analyzed, in order to draw some conclusions of good practice for the future, which are to be formalized.

Standard 10- Supervision
1. The management of ICBP"NS" initiates, applies and develops appropriate tools for supervision and control of the processes and activities specific to the department, in order to achieve them in conditions of economy, efficiency, effectiveness, safety and legality.
2. The management of ICBP”NS” must monitor the application of the control tools, to ensure that the procedures are respected by the employees effectively and continuously.
3. Supervisory activities involve reviews of the activity carried out by employees, testing through surveys or any other methods that confirm compliance with the procedures.
4. Coordinators of departments/laboratories check and approve the activities of employees, give the necessary instructions to ensure the minimization of errors and losses, the elimination of irregularities and fraud, compliance with the legislation and the correct understanding and application of the instructions.
5. The supervision of the activities is adequate, insofar as:
- each employee is informed of the assigned duties, responsibilities and competence limits;
- the activity of each employee is systematically evaluated;
- the results of the activity in various stages of its realization are approved.

Standard 11- Business continuity

1. The management of ICBP"NS" identifies the main threats regarding the continuity of processes and activities and ensures the appropriate measures so that its activity can continue at any time, in all circumstances and in all plans, regardless of the nature of the threat.

2. ICBP”NS” is an organization whose activity must be carried out continuously through the component departments/laboratories. The eventual interruption of its activity affects the achievement of the established objectives.

3. The coordinators of the departments/laboratories inventory the generative situations that can lead to discontinuities in activity and draw up a business continuity plan, which is based on the identification and evaluation of the causes that can affect operational continuity.

Current situations generating discontinuities: staff turnover; lack of coordination; poor management; fraud; destruction or loss of documents; difficulties and/or malfunctions in the operation of the equipment; malfunctions produced by some service providers; changes in procedures, political and/or legislative instability, etc.

4. The business continuity plan must be known, accessible and applied in practice by employees who have established tasks and responsibilities in its implementation.

5. The management of ICBP"NS" acts in order to ensure the continuity of the activity through measures to prevent the occurrence of situations of discontinuity, for example:

– documented procedures for managing situations that may affect the continuity of processes and activities;

- delegation, in case of temporary absence (leaves, departures on mission, etc.);

- hiring staff in place of those who have retired or left the public entity for other reasons;

– purchases to replace some inadequate equipment in the endowment;

- service for the maintenance of the equipped equipment.

6. The coordinators of the departments/laboratories ensure the continuous review of the business continuity plan, so that it always reflects all the changes occurring in the department/laboratory.

Standard 12- Information and communication

1. In the ICBP”NS” the types of information, their content, quality, frequency, sources, recipients must be established and an efficient internal and external communication system is developed, so that management and employees can effectively and efficiently perform their tasks , and that the information reaches the users complete and on time.

2. The quality of information and effective communication support the entity's management and employees in the performance of tasks, responsibilities and in achieving objectives, including the goal of internal managerial control.

3. The information must be correct, credible, clear, complete, timely, useful, easy to understand and receive.

4. Information must benefit from a rapid circulation, in all directions, including inside and outside, require reduced expenses, by avoiding parallelism, that is, the simultaneous circulation of the same information on different channels or several times on the same channel.

5. The management of ICBP”NS” establishes communication flows and channels to ensure the effective transmission of data, information and decisions necessary to carry out ICBP”NS” processes.

6. The communication system must be flexible and fast, both within the ICBP”NS” and between it and the external environment, and serve the purposes of the users.
7. Communication with external parties must be carried out through established and approved communication channels, respecting the limits of responsibility and delegation of authority, established by the Director.
8. The management of ICBP”NS” systematically and periodically reevaluates information requirements and establishes the nature, size and sources of information and data that correspond to satisfying the entity's information needs.
9. IT systems support adequate data management, including database administration and data quality assurance. Data management systems and operating procedures are in accordance with the entity's IT policy, mandatory security measures and personal data protection rules.

Standard 13- Document management
1. The director of ICBP”NS” organizes and manages the process of creation, review, organization, storage, use, identification and archiving of internal and external documents of ICBP”NS”, providing control over their complete life cycle and accessibility the entity's management and employees, as well as authorized third parties.
2. In the ICBP”NS” clear rules are defined and procedures are established regarding the registration, dispatch, drafting, classification, filing, protection and preservation of documents.
3. The director of ICBP”NS” organizes and monitors the process of receiving, registering and sending documents, and at the level of each department/laboratory, a record of received and sent documents is mandatorily kept.
4.In ICBP”NS” security measures are implemented to protect documents against destruction, theft, loss, fire, etc., as well as measures to comply with regulations regarding the protection of personal data.
5. The leadership of ICBP"NS" ensures the necessary conditions for employees to know and respect the legal regulations regarding access to classified documents and how to manage them.
6. In the ICBP”NS” a document storage/archiving system is created, according to a procedure, in order to ensure their preservation in good conditions and for them to be accessible to the personnel competent to use them.

Standard 14- Accounting and financial reporting
1. The director of ICBP”NS” ensures the smooth running of the processes and the exercise of the appropriate forms of internal control, which guarantee that the data and related information used for the preparation of the annual accounting statements and financial reports are correct, complete and provided on time.
2. The director of ICBP”NS” is responsible for organizing and keeping up to date the accounting and for the timely presentation of the financial statements on the state of the patrimony under his administration, as well as the budget execution, in order to ensure the accuracy of all the accounting information under his control .
3. The coordinator of the financial-accounting department ensures the quality of the accounting information and data used to prepare the accounting statements, which truly reflect the assets and liabilities of ICBP”NS”.

4. The annual financial statements are accompanied by annual performance reports in which the objectives, expected and achieved results, indicators and associated costs are presented for each program.
5. In the ICBP"NS" properly documented accounting procedures and controls are developed aimed at the correct application of the normative acts in the financial-accounting field and internal control.

Standard 15- Evaluation of the internal managerial control system
1. The director of ICBP"NS" assigns responsibilities for evaluating internal managerial control to the Coordinators of departments/laboratories, developing policies, plans and programs for this purpose. The director of ICBP"NS" orders and monitors the evaluation of the internal managerial control through the departments/laboratories, in accordance with annexes no. 3 and 4 of Order 600/2018.
2. The director of ICBP"NS" prepares, annually, by assuming managerial responsibility, a report on his own internal managerial control system.
3. The director of ICBP"NS" ensures the continuous verification and assessment of the operation of the managerial internal control system and its components, in order to timely identify the weak points, respectively the deficiencies of the internal control and to take corrective and/or elimination measures in their useful time.
3. The management of ICBP"NS" performs, at least once a year, a check and self-evaluation of its own managerial internal control system, in order to establish its degree of compliance with the managerial internal control standards.
4. The coordinators of the departments/laboratories within ICBP"NS" take appropriate and prompt measures to remedy the weak points, respectively the deficiencies identified in the self-assessment process of the internal managerial control system; these measures are transposed annually into a program for the development of the internal managerial control system.
5. The leader of the ICBP"NS" annually prepares a report on the managerial internal control system, as a basis for an action plan that contains the identified vulnerable areas, the control tools that need to be implemented, measures and directions for action to increase the capacity of internal control managerial in achieving the entity's objectives.

CHAPTER IV
Final provisions

Art. 23 All organizational structures and salaried staff of ICBP"NS" have the obligation:

- to carry out on time and at the highest quality level the tasks set by the management of ICBP"NS";

- to respect the application of laws and solicitude towards the institutions with which they collaborate.

Article 24

(1) The duties established by the present Organizational and Operating Regulations of the ICBP"NS" are detailed for each position in the organizational structure through the "Job Description".
(2) The job description defines and delimits, mainly, elements regarding the contribution to the achievement of the goals, functions, attributions and objectives of the institution, the content and expected results of the work that will be performed, the limits of authority, the requirements and conditions that must be fulfilled a person to fill that position.
(3) The job descriptions are changed whenever the duties of the positions change.

Art. 25 The leaders of all organizational structures are obliged to ensure the knowledge and compliance of this regulation by all subordinate personnel.

These Regulations have been updated in relation to:

-Government Ordinance no. 119/1999 on internal/managerial control and preventive financial control, republished, with subsequent amendments and additions
-Government emergency ordinance no. 86/2014 regarding the establishment of reorganization measures at the level of the central public administration and for the amendment and completion of some normative acts, approved with amendments and additions by Law no. 174/2015, with subsequent amendments
-Government Decision no. 21/2017 on the organization, functioning and duties of the General Secretariat of the Government, with subsequent amendments and additions
- Order no. 600/2018 regarding the approval of the Internal Managerial Control Code of public entities with Annexes that are an integral part of this Order

Date of approval by the Scientific Council 31.10.2023

DIRECTOR,

SCIENTIFIC SECRETARY,

Acad. Maya Simionescu

Dr. Felicia Antohe

Institute of Cellular Biology and Pathology
"Nicolae Simionescu"
8, B.P. Hasdeu Street, POB 35 – 14, Bucharest, Romania
Phone: (+4021) 319.45.18; 319.45.20; www.icbp.ro

APPROVED

THE PRESIDENT OF THE BIOLOGICAL SCIENCES SECTION

Acad. Maya SIMIONESCU

INTERNAL REGULATIONS
-
"NICOLAE SIMIONESCU"
INSTITUTE OF CELLULAR BIOLOGY AND PATHOLOGY
OF THE ROMANIAN ACADEMY

INTERNAL REGULATIONS

On the 15th of April , 1978, according to Decree no. 152, the Institute of Cellular Biology and Pathology was established; from its establishment until 1990, the Institute was subordinated to the Ministry of Education and Training, after which it entered the structure of the Academy

The official name of the Institute is: "Nicolae Simionescu" Institute of Cellular Biology and Pathology.

The institute has the following objectives:

a. basic biomedical research and the transfer of results to the clinic.

b. ensuring the specialization and improvement of personnel in the field of cell biology and pathology, through post-university courses, specialization internships, doctorates and other forms;

c. supporting the educational process in the subjects of biology and cell pathology in which students of the faculties of biology, medicine, pharmacy, chemistry, physics etc.

d. promoting modern cellular biology and pathology in Romania;

e. the amplification of international scientific exchanges;

As part of its activity, the Institute of Cell Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" collaborates with research institutes, higher education institutions and other units interested in scientific research and the application of results in the field of cell biology and pathology.

Also, the Institute collaborates, on the basis of conventions and agreements, with specialized Institutes from abroad, with international profile bodies, as well as with prestigious scientific personalities in the field of biology and cellular pathology.

The management of the Institute elaborated the present regulation approved by the Scientific Council of the Institute.

CHAPTER I

GENERAL DISPOSITIONS

Art.1 (1) The Internal Regulation of the Institute is drawn up in accordance with the Romanian Constitution; Labor Code; Finance Law no. 500/2002, Law 153/2017 Framework on the remuneration of personnel paid from public funds; Law on the unitary pension system no. 263/2010 with subsequent additions and amendments, HG no. no. 250/1992- regarding vacation leave and other leaves of employees from the public administration, from the autonomous regions with special specificity and from the budget units, with subsequent amendments and additions, Order 600/2018 regarding the approval of the Code of Internal Managerial Control of Public Entities, Order 974 /2020 regarding the establishment of the criteria for evaluating individual professional performance for contractual staff and the evaluation form for executive and management staff, OMFP 1917/2005-Order for the approval of the Methodological Norms regarding the organization and management of the accounting of public institutions and its application instructions , with subsequent amendments and additions, Law 752/2001-concerning the organization and operation of the Romanian Academy, with subsequent amendments and updates and with the Statute of the Romanian Academy. The internal regulation is intended to ensure the general framework of the Institute's activity and the necessary conditions for a good development of the research activity.

(2) The provisions of this Internal Regulation apply to all employees of the Institute, regardless of function, duties, place of work or duration of the contract.

(3) It also applies to those who are seconded within the Institute, to those who are pursuing a specialization or doctorate, to those who carry out collaborations in the field of scientific research, as well as to students and master's students who carry out internships or complete graduation theses in the Institute .

Art. 2. - These Internal Regulations specify the organization of research work, the rules regarding protection, hygiene and safety at work, the rights and obligations of the Institute and the employees, the procedure for resolving individual requests or complaints of employees, the rules regarding work discipline in the unit, disciplinary violations and applicable sanctions and the methods of application of specific legal or contractual provisions.

Art. 3. - (1) Labor relations are based on the principle of consensuality and good faith.

The rights and obligations regarding the labor relations between employer and employee are established according to the law and individual labor contracts.

Employees cannot waive their rights recognized by law.

Any transaction aimed at waiving the rights recognized by law to employees or limiting these rights is null and void.

Art. 4. For the smooth development of labor relations, the Institute and the employees will inform and consult each other, in accordance with the law.

Art. 5. - (1) Knowledge of and compliance with the Internal Regulation is mandatory for all categories of personnel within the Institute.

(2) Employees with the duties of heads of departments/departments will inform each employee of the content of this Internal Regulation and will make it available to them, upon request, for documentation and consultation.

(3) Any interested employee may notify the Institute regarding the provisions of the Internal Regulations, to the extent that he proves the violation of his right.

Art.6 (1) The "Nicolae Simionescu" Institute of Cellular Biology and Pathology is managed by the director together with the scientific council.

(2) The appointment of the director is made by the President of the Romanian Academy by decision for a period of four years, after the validation by the Presidium of the Romanian Academy of the results of the competition organized according to

the "Regulations for occupying management positions in the research units of the Romanian Academy" ;

(3) The appointment of the deputy director and the scientific secretary is made by decision of the head of the institute, for a period of four years, following the result of the competition organized according to the "Regulations for occupying management positions in the research units of the Romanian Academy"

(4) The scientific council consists of the president, the scientific secretary and a number of members. The director is the president of the Scientific Council. The members of the Romanian Academy who work in the Institute, the deputy director, the scientific secretary and the persons with the attributions of head of the research departments are members of the Scientific Council by right.

CHAPTER II

THE RIGHTS AND OBLIGATIONS OF THE INSTITUTE AND THE EMPLOYEES

1. THE RIGHTS OF THE MANAGEMENT OF THE INSTITUTE

Art. 7. Management The Institute has, mainly, the following rights:

• to establish the organization and functioning of the activities carried out within the Institute;

• to establish the appropriate duties for each employee, according to the law;

• to give binding provisions for the employee, subject to their legality;

• to exercise control over the way of performing work tasks;

• to ascertain the commission of disciplinary violations and to apply the appropriate sanctions, according to the law and the internal regulation.

2. OBLIGATIONS OF THE MANAGEMENT OF THE INSTITUTE

2.1 General obligations:

Art.8 The director has the following attributions:

- to represent the institute in its relations with other institutions in the country and abroad;

- is a tertiary credit orderer, according to the law;

- to elaborate in collaboration with the Deputy Director, the Scientific Secretary and heads of scientific departments the scientific research plan of the Institute and submit it to the discussion of the Scientific Council and the approval of the Biological Sciences Section of the Romanian Academy;

- to organize and control the activity of the Institute to ensure the optimal realization of the research plan;

- to follow the publication and exploitation of the results of scientific research.

- performs the duties that fall to him, according to the laws and the Statute of the Romanian Academy.

Art. 9 The management of the institute (Chap. I, art. 6.1) has the following obligations:

a. to ensure the favorable framework for the development of the research plan, to follow the publication and valorization of the scientific research results, to verify the correctness of the results and to take severe measures against those who report erroneous results in bad faith;

b. to ensure the rational use of the premises, equipment, materials, energy resources;

c. to take all the necessary measures for the good organization and development of the activity in safe conditions, for the permanent supervision of the devices and installations, of all the norms of exploitation, maintenance, repairs, maintaining order and discipline, organizing the systematic control of the duties of the Employees and drawing to the responsibility of those who violate service obligations;

d. to provide employees with the appropriate technical equipment available to the Institute, materials, documentation and protective and work equipment, to take measures to ensure their proper condition in order to make full use of the research capacity and full and efficient use of time For work;

e. to establish regulations compatible with international provisions and the code of ethics regarding the breeding, accommodation and use of experimental animals;

f. to take measures to improve the working conditions, ensure the conditions of labor protection and compliance with the hygienic-sanitary norms according to the legislation in force;

g. to ensure the conditions for the improvement and specialization of the staff in order to increase the value of the scientific and, in general, professional activity;

h. to ensure the achievement of the objectives of the Institute's activity, so that the staff can benefit from the rights deriving from the quality of employee, provided in the Labor Code and in other normative acts;

i. to take measures for the issuance of access cards (in the institute)/Employees' identification cards.

j. to establish individual performance objectives, as well as the evaluation criteria for their achievement;

k. to ensure the application of the legal provisions in force regarding health and safety at work, including the determination of possible risks that would endanger the running of activities and failure to achieve the intended objectives.

Art 10. to ensure free access to information of public interest according to the laws in force.

Art. 11. to protect professional secrecy until the results are published in specialized magazines.

3. THE RIGHTS OF THE EMPLOYEES OF THE INSTITUTE

Art.12 The staff of the Institute has the following rights:

a. to ensure stability in work, the service or work relationship not being able to terminate or be modified except in the cases provided for by law;

b. to benefit from appropriate working conditions, labor protection measures, social insurance allowance in case of temporary loss of working capacity, pension and other social insurance rights provided for by law;

c. to receive for the submitted activity the salary rights established according to the law, in relation to the professional training, the submitted activity and the performance of the service obligations;

d. to ensure weekly rest and annual paid vacation leave, under the conditions of the law;

e. to benefit from paid or unpaid study leave, under the conditions of the law;

f. to receive support and facilities for improving professional training;

g. to benefit from equal opportunities and treatment according to the law;

h. to cumulate within the ICBP-NS to the basic position and other norms remunerated from funding sources, other than those from the State Budget, under the conditions provided by the legislation in force;

4. OBLIGATIONS OF THE EMPLOYEES OF THE INSTITUTE

Art.13 The employees of the Institute are responsible for the correctness of the results of the scientific research undertaken and for managing the entrusted heritage. Each Employee is responsible for the fulfillment of his own duties and for the smooth running of the general activity of the Institute.

Art.14 The persons employed in the Institute have the following general duties:

a. to respect the work schedule and to use the working time fully and efficiently to fulfill the service obligations;

b. to carry out activities according to both the specialized training and the needs of the Institute; in special situations, determined by the need to ensure the good functioning of the Institute, everyone has the obligation to participate - independently of the function or position they occupy - in the execution of any works and in taking all the measures required by the needs of the Institute;

c. to comply with the rules and instructions regarding the performance of the activity provided for in the Internal Regulation and other internal regulations;

d. to know the constructive and functional peculiarities of the devices, machines and installations with which they work, to apply the norms of their operation and maintenance;

e. to efficiently use reagents, equipment, energy resources and to take the necessary measures to avoid waste and negligence in the preservation and administration of entrusted goods;

f. to comply with the norms of labor protection, use of protective and work equipment, fire prevention or other situations that could endanger the building, the Institute's facilities or the life, bodily integrity or health of some people;

g. to notify the hierarchical boss as soon as he becomes aware of the existence of irregularities, deviations, difficulties or shortages at the workplace, proposing measures to improve the activity, in relation to the possibilities of the Institute;

h. not to leave devices, machines and installations in operation without supervision during the work schedule or outside of it;

i. not to leave the workplace until the arrival of the shift, where there is uninterrupted work; in case of non-presentation of the exchange, to notify the hierarchical boss in order to take the necessary measures;

j. to show up to work in full working capacity, in order to properly perform their duties;

k. to take urgent measures to liquidate damages and the consequences of accidents, to be at the disposal of the Institute or to report to work as soon as possible in case of damages or other needs;

l. to respect the rules of access to the Institute and not to receive people from outside the Institute except in accordance with the rules established in the Internal Regulations;

m. to signal to the person with the duties of a duty officer the devices that operate after the program hours and the parameters of normal operation;

n. to maintain order and cleanliness at the workplace;

o. to respect the confidentiality of documents or information that are not published; research ideas and themes that present elements of novelty or priorities are considered confidential documents;

p. to have a civilized behavior in work relations;

r. to notify the superior in the shortest possible time, but no later than 24 hours, if he is absent from work for valid reasons - accident, illness, etc.

Art.15 The persons with the attributions of department heads and the persons with the attributions of heads of departments/laboratories are responsible for achieving the necessary conditions for the complete safe operation of research installations, machines and devices, for the prevention of accidents or fires, for equipping the places of working with the necessary technical operating instructions, performing technical inspections on time, taking all measures to avoid any accidents or accidental interruptions.

Art. 16 In addition to the obligations stipulated in Art. 13 and 14, the research staff is required to meet the following requirements:

b. to contribute to the expansion and diversification of scientific research in the field of cellular and molecular biology and pathology;

c. to actively participate in scientific debates, in the confrontation of ideas in the specialized scientific field and to contribute, in this way, to defining the directions of research progress, to establishing the means for improving the research process and the valorization of scientific results through publications ;

d. to participate in the training of young people for scientific research by passing on their own experience and knowledge;

e. to maintain absolute discretion over confidential data and scientific results not yet published;. not to engage, in any form, to carry out works or to provide data to natural or legal persons, foreign to the Institute, except with the approval of the Institute's management;

f. have the obligation to submit activity reports requested by the Institute's management; any information on these data, requested from outside the Institute, will be provided only with the approval of the management;

g. the periodic capitalization through publications, communications or other forms of the scientific results obtained in the Institute will be done only with the consent of the Institute's management;

h. upon prolonged temporary leave or permanent leave of the Institute (extended sick leave, maternity leave, leave without pay, transfer, resignation), the employees

engaged in the scientific research activity will hand over to the Institute management all the materials containing information on the scientific research carried out in Institute published or unpublished (workbooks, iconography, preparations, etc.), as well as the materials and reagents held for these researches.

Art.17 It is prohibited:

a. presence in the Institute of persons under the influence of alcoholic beverages; those in this situation will be evicted from the Institution, with the loss of salary rights for the respective day; in case of repetition of these circumstances, severe disciplinary measures will be taken, according to the law; the production of damages to the Institute by Employees under the influence of alcohol determines the termination of the employment contract and the recovery of the damage.

b. the unofficial introduction into the Institute of materials that could cause contamination, poisoning, fires or explosions;

c. smoking in the institute is only allowed in the places designated for this purpose;

d. practicing other activities that are not intended or subordinated to the research process without the approval of the institute management;

e. leaving the workplace unjustified or using working time for purposes other than those that are in the interest of the Institute;

f. executing works of personal interest within the premises of the Institute during work, as well as preventing others from fulfilling their work obligations;

g. carrying out any activities that could endanger the security of the Institute, of one's own person or of others;

h. committing immoral, violent acts or ill-treating people or animals, uttering insults or slander or damaging property;

i. removing from the Institute substances, materials, instruments or any other assets belonging to the Institute, without legal supporting documents, countersigned by the management;

j. leaving the Institute during program hours without a permit, work delegation or other supporting documents;

k. leaving the Institute through a place other than the one established for staff access.

CHAPTER III

GENERAL RULES OF PROFESSIONAL CONDUCT OF THE EMPLOYEES OF THE INSTITUTE

Art.18 In the exercise of their duties, the Institute's employees have the obligation to behave professionally and in accordance with the Institution's internal norms.

Art.19 The employees of the Institute have the obligation to, through their behavior, respect the Constitution, the laws of the country and to act for the implementation of the legal provisions, in accordance with their attributions, respecting professional ethics.

Art. 20 (1) The employees of the Institute have the obligation to loyally defend its prestige, as well as to refrain from any act or fact that may harm the image or legal interests of this institution.

(2) Employees of the Institute are prohibited from the following:

a. to publicly express assessments inconsistent with reality regarding the institution's activity, its policies and strategies or its development projects;

b. to make unauthorized judgments in connection with the disputes that are being resolved and in which the Institute is a party;

c. to disclose information that is not public, under conditions other than those provided by law, if they are not authorized to do so;

d. to disclose the information to which they have access in the performance of their duties, if this disclosure is of a nature to attract undue advantages or to prejudice the Institute's image or rights;

Art.21 (1) In the interpersonal relations of the employees of the Institute, as well as with other natural or legal persons, the employees are obliged to behave based on respect, good faith, correctness and kindness.

(2) Employees have the obligation not to harm the honor, reputation and dignity of the people within the Institute, as well as the people they come into contact with in the exercise of their duties, by:

a. the use of offensive expressions;

b. revealing some aspects of private life;

c. formulating slanderous notifications or complaints.

(3) The employees have the obligation to use the working time, as well as the goods belonging to the Institute, exclusively for carrying out the activities related to the established service attributions.

CHAPTER IV

Employment criteria

Art.22 Employment within the ICBP is done under the conditions of the law, based on the decision of the director of the Institute.

Art.23 (1) Hiring is done through competition or, as the case may be, examination, for vacant positions.

(2) Existing vacancies in the staff list will be put out to competition.

(3) To fill a vacant or temporarily vacant contractual position, the candidate must meet the following general conditions according to art.3 of the Regulation - framework approved by Government Decision no.286 of March 23, 2011, art.15 of H.G.1336/2022 regarding the Regulation -framework regarding the organization and career development of contractual staff in the budgetary sector paid from public funds:

a) has the Romanian citizenship or of another member state of the European Union, of a state party to the Agreement on the European Economic Area (EEA) or the citizenship of the Swiss Confederation;

b) knows the Romanian language, written and spoken;

c) has the capacity to work in accordance with the provisions of Law 53/2003-Labor Code, republished, with subsequent amendments and additions;

c) has the minimum age regulated by the legal provisions;

d) has full exercise capacity;

d) has a state of health corresponding to the position for which he is applying, attested on the basis of the medical certificate issued by the family doctor or by the competent health units;

e) fulfills the conditions of studies and, as the case may be, seniority in the specialty or other specific conditions according to the requirements of the position put up for competition;

f) has not been definitively convicted for committing a crime against national security against humanity, crimes of corruption or service crimes, crimes of forgery or against the administration of justice, crimes committed with intent that would make a candidate for a position incompatible with the exercise of the contractual function for which he is applying, except for the situation in which rehabilitation has taken place.

g) he does not serve a complementary punishment by which he was prohibited from exercising the right to occupy the position, to exercise the profession or trade or to carry out the activity that was used to commit the crime, or the safety measure of the prohibition of occupation was not taken in relation to this a function or the exercise of a profession.

(4) The competition announcement will be published in a central newspaper, on the internet page or by display at the Institute's headquarters, at least 30 calendar days before the date of the competition for research positions and on the posturi.gov.ro portal through to the e-mail address posturi@gov.ro and on the website of the Institute at least 15 days before the date of the competition or exam for filling a vacant position, respectively at least 10 working days for filling a temporary vacant position for staff contractual.

(5) The composition of the competition or examination commission for employment or promotions is determined by the decision of the director of the Institute. The commission is led by a president, and the secretary of the examination commission is responsible for the good organization and development of the competition and is not a member of the commission.

(6) The competition will consist of a written test and an oral test or interview, as the case may be, for contractual staff, for research staff, the competitions are organized

according to Law 319/2003 on the status of research and development staff and according to GD no. 1336/ 2022 for contract staff

Art.24 (1) Hiring for the occupation of research positions (a minimum average of 8 is required to pass the exam), execution or management is done after the prior verification of the professional skills of the applicant, in order to assess the ability to occupy the respective position, based on evaluation criteria with the establishment of a trial period.

(2) The trial period is:

a) max 90 calendar days for research and execution functions,

b) max 120 calendar days for management positions and constitutes length of service.

(3) Advancement in professional grade for staff employed in research functions is done only on a vacant position, and for contractual staff employed in execution functions, it is done upon request, by changing the position occupied by the employee and in relation to:

a) minimum experience of 3 years in the previous professional degree,

b) the results obtained in the activity, according to the last evaluation,

c) passing a written and oral exam with a minimum average of 8.

(4) The individual employment contract concluded between the employer and the employee must include the elements provided in the framework model, approved by Order of the Ministry of Labor and Social Solidarity no. 2171/2022, with subsequent amendments and additions. After the conclusion of the individual employment contract the employee takes note of the provisions of this regulation.

The elements of the individual employment contract can be changed under the conditions of the law the legislation in force.

The job description is an annex to the individual employment contract and is an integral part of it.

Employees of the Institute who are on leave granted according to the legal provisions or whose individual employment contracts are suspended under the law,

are granted on the date of resumption of activity, the basic salary related to the professional grade or step in which they were assigned before the suspension.

CHAPTER V

ORGANIZATION OF WORKING TIME IN THE INSTITUTE

Art.25 The usual duration of working time in the Institute is on average 40 hours per week, 8 hours per day, five days per week. Within a week, the daily work schedule is differentiated by fields of activity.

Art.26 The weekly rest is ensured for all staff on Saturdays and Sundays and on legal holidays, with the exception of persons with the duties of duty officers and guards - porters, to whom the weekly rest can be granted on other days, according to the shift schedule.

Art.27 The modification of the work schedule, as well as the organization of the shift schedule in certain compartments, are made by the Institute's management in relation to the research needs, in compliance with the legal provisions.

Art.28 The persons with the duties of heads of departments/laboratories and of the other work collectives have the obligation to organize the activity in the compartments they coordinate in such a way that the job duties, specified in the job descriptions they draw up for subordinate personnel, are carried out in most cases during working hours. Together with the economic-administrative sector, they ensure the correct recording of the working time performed. The job descriptions will be recorded by the Institute's management.

Art. 29 (1) The performance of work beyond the normal duration is allowed in special situations (preventing or removing the effects of calamities or other cases of force majeure, repairing machinery or installations, etc.), as well as based on the provisions and approval of the Institute's management.

(2) In order to ensure the smooth development of the Institute's activity, work beyond the normal duration can also be performed in situations required by the specifics of the research activity. In this situation can be the personnel who work on rest days for the continuation of some experiments, for the supervision of laboratory animals, for

the finalization of some works in order to fit into the established terms and to ensure the good functioning of the equipment and installations.

(3) The activities beyond the normal working hours will be recorded in the "Register of evidence of presence in the Institute outside the program hours" and approved by the hierarchical superior and the management of the Institute.

(4) The hours worked overtime without these approvals recorded in the Register of attendance at the Institute outside the hours of the program are not taken into account for any requests for compensation for the time worked overtime.

Art.30 The time in which a person performs work beyond the normal working time is compensated according to the laws in force in the following 60 days; the compensation of the hours provided by the employees with duties of officers on the Institute can be done in the next 60 days.

Art.31 (1) Pregnant women and those who are breastfeeding will not be used in medically contraindicated activities and will not work overtime. The time for the care and feeding of the child is granted according to the legislation in force.

(2) Also, people who work with a reduced schedule, given to restore their health, will not work overtime.

Art.32 (1) The service at the Institute outside the program hours is provided by the employees with duties of service officers hired for this purpose and among the executive staff, according to the monthly schedules approved by the Institute's management. Failure to show up for guard duty is sanctioned by the withdrawal of a step or gradation for a period of 3 months, after a prior disciplinary investigation

Art.33 The security of the Institute is organized by the administrative economic department and is carried out by the security personnel employed for this purpose. The security plan of the Institute is presented in Annex 1.

Art. 34 (1) Evidence of the presence of staff at the work schedule is kept through attendance conditions. Each employed person has the obligation to personally sign the attendance certificate, daily, upon entering and leaving work. Those who have not signed the condition of presence, do not have a leave ticket in the interest of work or personal, delegation or medical certificate, are considered absent without reason on the respective day.

(2) The attendance conditions will be made available to the staff in the morning. At the beginning of the program of each category of personnel, the conditions will be withdrawn by the responsible employee designated from the administrative economic compartment; the person in charge will record attendance, delays, motivated and unmotivated absences. At the end of the program, the present conditions will be made available to the staff according to the program of each category, after which they will be kept by the employees with duties of service officers.

(3) Departures during the program, in the interest of work or personal, are made only on the basis of permission tickets (delegations) that were previously issued by the heads of departments / laboratories and approved by the Institute's management.

Art.35 (1) Leave in personal interest can only be taken with the prior approval of the Institute's management, without which leaving the Institute in personal interest is considered an unmotivated absence.

(2) The time not worked as a result of requests in personal interest, up to 4 hours, is calculated by equating hour to hour. A personal leave of over 4 hours per day is equivalent to one working day.

(3) Time not worked as a result of delays is compensated in the following 7 days.

(4) Non-working time can be:

- compensated by overtime;

- compensated by guards, if the needs of the Institute require it;

- compensated by vacation days.

(5) Delays and excessive personal absences are considered violations of work discipline and may be sanctioned according to the Labor Code.

Art. 36 Access to the Institute is allowed on the basis of the access card/service ID issued every six months, the provisional permit mentioned in art. 38 para. 2 and entrance tickets.

Art.37 In the compartments where they carry out their activity, the employees of the Institute will wear gowns, protective or work equipment. The card/identity card cannot be alienated.

Art. 38 (1) The person who loses his card/identity card, or the equipment with the Institute's insignia, is obliged to immediately notify the hierarchical superior and the economic-administrative department.

(2) Persons who have lost their service cards/identification cards will be issued temporary access permits until new identification cards are issued according to the legal provisions.

(3) The record of lost or stolen cards will be carried out by the economic-administrative department, which has the obligation to communicate this to the security personnel in order to prevent their use by other persons.

Art.39 It is forbidden for people outside the Institute to photograph/record in the Institute without the approval of the director of the Institute.

Art.40 Short-term access to the Institute by a person from outside is allowed on the basis of the identity card or identity card, with the telephone announcement of the requested Employee, who will pick it up from the entrance hall and will be responsible for the behavior of that person in the Institute.

Art.41 After finishing or outside the program hours, the presence of the staff in the Institute is allowed with the consent of the higher hierarchical boss. Employees with the duties of duty officers have the obligation to keep records of the persons remaining in the Institute outside of the program hours.

Art. 42 (1) In the case of employment with an individual work contract at home, in special situations, both the employees and the management of the Institute have the same rights and obligations, stipulated in the individual work contract and in these Internal Regulations.

(2) Home-based employees perform their specific tasks, establishing their schedule in agreement with the Institute's management and respecting the rules specific to scientific research activity.

(3) In the content of the individual work at home contract, it is mandatory to expressly mention the fact that the employee works at home, the schedule in which the employer has the right to control the employee's activity and the specific way of carrying out the control, the way of verifying the fulfillment of tasks and responsibilities provided in the job description according to the Labor Code.

Art. 43 (1) Employees have the right - under the law - to a paid holiday every calendar year.

(2) Rest leave is granted to employees in accordance with the legal provisions and is granted proportionally to the activity performed in a calendar year.

For employees employed during the year, the duration of the vacation leave is determined proportionally to the period worked from employment to the end of the respective calendar year.

(3) The rest leave is carried out every year.

If the employee, for justified reasons, cannot take, in whole or in part, the annual leave to which he was entitled in the respective calendar year, with the consent of the person in question, the employer is obliged to grant the unused leave in a period of 18 months starting with the year following the one in which the right to annual leave was born.

Compensation for unused vacation is allowed only in case of termination of the individual employment contract.

(4) The vacation is carried out on the basis of an individual appointment established by the employer with the consultation of the employee. Programming is done until the end of the calendar year for the following year.

(5) Individual programming can determine the date of the leave or, as the case may be, the period during which the employee has the right to take the leave, a period that cannot exceed 3 months.

(6) Within the leave periods established according to paragraph (4), the employee can request the leave at least 30 days prior to its taking.

(7) In case the vacations are scheduled in fractions, the employer is obliged to establish the schedule in such a way that each employee takes at least 10 working days of uninterrupted leave in a calendar year.

Proposals for the nominal scheduling of holidays are made by department heads after prior discussion with subordinate staff and are approved by the Institute's management. The employees of the Institute are obliged to take their vacations on the planned date. In unforeseen cases, rescheduling is allowed.

(8) Employees may be recalled from leave, by written order of the Institute's management, for unforeseen service needs, which require the presence of those in question at the Institute.

(9) The records of vacations are kept by activity departments and by the human resources department.

Art. 44 (1) According to the regulations in force, employed persons may request, after the exhaustion of the legal vacation leave, unpaid leave for professionally justified reasons: appearing for exams, supporting the doctoral thesis, training doctoral students with scholarships, specializations abroad, etc. .

(2) The length of service during the leave without pay will be established in accordance with the provisions of the law.

Art.45 (1) Employed persons have the right to allowances in case of temporary loss of work capacity, according to the legislation in force.

(2) Persons who have lost their ability to work are obliged to notify the Institute without delay about the state of their health and to present the supporting documents in this sense.

(3) For serious cases, family members have this duty, so that the person in question can benefit from the rights due to him.

CHAPTER VI

LABOR HYGIENE AND SAFETY RULES

Art.46 Each employee has the obligation to ensure the application of measures related to his safety and health at work, as well as that of other employees, according to the legislation in force.

Art. 47 (1) In case of special events, accidents at the workplace, each employee will urgently inform the management of the Institute.

(2) All accidents occurring during service, especially those with serious consequences, will be immediately brought to the attention of management.

(3) The same rules will be respected in the case of accidents occurring on the home-work route and vice versa.

Art.48 In order to ensure safety at the workplace, employees have the following obligations:

a. employees are responsible for complying with the rules of hygiene and work safety techniques;

b. it is prohibited to keep, distribute or sell substances or medicines whose effect can produce behavioral disturbances, within the Institution's premises;

c. it is prohibited to introduce, distribute or facilitate the introduction of alcoholic beverages in the premises of the Institution, with the exception of festive days of the Institute.

CHAPTER VII

RULES REGARDING COMPLIANCE WITH THE PRINCIPLE OF NON-DISCRIMINATION AND AL

REMOVAL OF ANY FORM OF VIOLATION OF DIGNITY

Art. 49 (1) The principle of equal treatment for all employees operates within the labor relations.

(2) Any discrimination against an employee is prohibited, according to the legislation in force.

Art. 50. (1) Every employee benefits from working conditions appropriate to the activity carried out, social protection, security and health at work, as well as respect for his dignity and conscience, without any discrimination.

(2) The right to equal pay for equal work, the right to the protection of personal data, as well as the right to protection against illegal dismissals are recognized to all employees who perform a job.

Art. 51. Sexual harassment of a person by another person at the workplace is considered discrimination based on gender and is prohibited and may be sanctioned according to the legislation in force.

Art. 52. (1) Employees have the obligation to make efforts to promote a normal work climate in the unit, respecting the provisions of the law, employment contracts, internal regulations, as well as the rights and interests of all employees.

(2) In order to create and maintain a working environment that encourages respect for the dignity of each person, procedures for the amicable resolution of individual employee complaints, including those regarding cases of violence or sexual harassment, can be carried out, in addition to those provided by law.

CHAPTER VIII

DISCIPLINARY ACTIONS

Art.53 (1) Violation of service obligations, including plagiarism, any fraud or deviation from the rules of conduct, constitutes a disciplinary offense and is sanctioned as such, regardless of the function or position held by the person who committed it.

(2) Disciplinary sanctions are applied according to Art. 248 paragraph 1 of the Labor Code and are the following:

a) the written warning;

b) demotion from the position, with the granting of the salary corresponding to the position in which the demotion was ordered, for a duration that cannot exceed 60 days;

c) reduction of the basic salary for a duration of 1-3 months by 5-10%;

d) reduction of the basic salary and/or, as the case may be, the management allowance for a period of 1-3 months by 5-10%;

e) disciplinary cancellation of the individual employment contract. Art. 54. (1) When establishing the sanction to be applied to a person for the offense committed, the causes and gravity of the act, the conditions in which it was committed, the degree of guilt of the person in question, whether or not he had deviations, as well as the consequences of the deviation on the smooth running of the Institute.

(2) Under the penalty of absolute nullity, no measure, with the exception of the one provided for in art. 248 para. (1) lit. a) The Labor Code cannot be ordered before a preliminary disciplinary investigation has been carried out. The person in question will be heard and the claims made by him in his defense will be investigated

Art.55 (1) In order to initiate disciplinary action, it is necessary that the Institute's management be notified in advance about the commission of a violation. As a rule, the reporting document is drawn up by the hierarchical boss of the one in question.

(2) The report (finding) can be drawn up in the form of a report that includes data about the name and surname of the accused: function, place of work, description of the offense, degree of guilt, discussion of defenses, disciplinary antecedents, sanction proposal.

(3) The management of the unit, receiving the referral, entrusts the performance of the preliminary investigation to a competent and neutral commission.

(4) The commission that conducts the investigation must document itself on the conditions and circumstances of the facts considered as misconduct. It must collect the evidence that can lead to the establishment of the factual situation and the guilt, the statements (explanatory notes of the people who witnessed or took direct knowledge of the commission of the offense).

(5) The commission that carries out the investigation must summon the accused, show him what the accusation consists of and listen to him in relation to the deed he is accused of.

(6) Taking into account its importance, the proof of listening to the accused is made with his written explanatory note or with the act by which the person conducting the investigation relates what the accused declared in his defense.

(7) The explanatory note is always made in writing and must be signed by the accused. If the accused refuses to give the explanatory note, a verbal process will be concluded with 2 witnesses to record the refusal to give the explanatory note. The signature of the witnesses and the one doing the research always becomes mandatory. Listening to the accused and verifying his arguments in his defense must be prior to the application of the sanction, and non-compliance with these conditions, imperatively imposed by the law, leads in certain cases to the annulment of the sanctioning decision.

Art.56 In the case of violation of the rules regarding order and discipline at the workplace, the staff of the compartment to which the guilty person belongs can discuss the committed violation, request and propose to the Institute's management in writing, the application of disciplinary sanctions.

Art.57 (1) The bodies authorized to apply disciplinary sanctions are, within the limits of their competence, the following: heads of departments, the director, the scientific council.

(2) The "warning" sanction can be applied by department heads; the other sanctions are applied by the management of the Institute.

(3) For the staff appointed by the higher hierarchical forum, the disciplinary sanction is applied by that forum.

(4) For the staff appointed with the approval of the higher hierarchical forum or the Scientific Council, the termination of the employment contract is done with the approval of these forums.

Art.58 Disciplinary violations committed by a person assigned to work during the delegation to another unit, are sanctioned by the management of the unit that delegated it.

Art.59 (1) Disciplinary termination of the employment contract cannot be done while the person in question is on leave for temporary incapacity for work, in case of pregnancy, during maternity leave, while taking care of the sick child in age up to 3 years.

(2) The decision regarding the disciplinary termination of the employment contract is communicated to the person in question within 5 days, under the signed hatred. It produces its effects from the date of communication.

Art.60 Criminal or material liability, or the application of a measure of moral influence does not exclude disciplinary liability for the committed deed, if by this work obligations were also violated.

Art.61 (1) The disciplinary sanction can be established and must be communicated in writing to the person in question within no more than 30 days from the date when the person entitled to apply it became aware of the commission of the offense, without being able to exceed 6 months from the date the offense was committed. If these terms have expired, the disciplinary sanction can no longer be applied.

(2) In the written communication that is made to the employed person, in relation to the sanction applied, the means of appeal, the deadline for filing the complaint and the competent bodies to resolve the complaint will also be provided.

(3) The disciplinary termination decision of the individual employment contract is issued in writing and, under the penalty of absolute nullity, must be motivated in fact and in law and include details regarding the term in which it can be contested and at

the court at which is contested. Art.62 (1) Against the disciplinary sanction, the sanctioned person can make a written appeal within 30 days from the notification of the sanction. The appeal is resolved within 30 days by:

a. the person occupying the hierarchical position immediately superior to the one who applied the sanction;

b. Scientific Council for sanctions applied by the director;

c. court, if the sanction consists in the disciplinary termination of the employment contract.

(2) In these cases, the pronounced decisions are final.

Art.63 The disciplinary sanction applied to a person - with the exception of the termination of the employment contract - is considered not to have been taken if the employee has not committed another offense within one year of its execution.

CHAPTER IX

RESOLVING THE PROPOSALS, COMPLAINTS AND REQUESTS OF THE EMPLOYEES IN THE INSTITUTE

Art.64 (1) The management of the Institute examines and clarifies the reported problems of personal or general interest and is responsible for solving them promptly, according to the laws.

(2) The management of the Institute is responsible for the objectivity of the research carried out, for the validity and fairness of the conclusions drawn and the legality of the established measures, for the accuracy and effectiveness of the answers given.

Art.65 Notifications and complaints directed against the activity of the Institute's management are investigated and resolved by the hierarchically superior forums.

Art.66 Examining and resolving them is mandatory within 30 days of receipt. For those that require a longer research, the term can be extended by a maximum of 30 days by the head of the Institute. Exceptionally, for those that cannot be resolved within this term, longer extensions can be approved.

Art.67 The management of the Institute will ensure the investigation and quick and thorough resolution of the problems raised by the employees, in compliance with the legal provisions.

CHAPTER X

FINAL PROVISIONS

Art.68 (1) The Internal Regulation is approved by the Scientific Council and signed by the Director of the Institute and the Scientific Secretary. After signing, the Internal Regulation will be made known to all Employees.

(2) The Internal Regulation can be amended, according to the procedure provided for its preparation, whenever the needs related to the good organization of the activity and work discipline in the Institute require changes.

Art.69 The adopted Internal Regulation is updated according to the laws and modified under the conditions stipulated by the legal provisions.

Art.70 These Internal Regulations are completed with all Operational Procedures existing on the date of its issuance or issued after approval within the ICBP.

Date of approval by the Scientific Council .....

Signing date

DIRECTOR,

SCIENTIFIC SECRETARY,

Acad. Maya Simionescu

Dr. Felicia Antohe

Două cercetătoare de la Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” au câștigat Bursa L’Oréal-UNESCO 2025

Cercetătoarele Teodora Barbălată şi Mădălina Gheţu, de la Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” al Academiei Române, sunt laureate ale Bursei L’Oréal-UNESCO „Pentru Femeile din Ştiinţă”, ediția 2024-2025, secțiunea „Științele Vieții”. Gala de premiere *a celei de-a XV-a ediții a acestui program de burse private, derulat în parteneriat cu Comisia Națională a României pentru UNESCO*, s-a desfășurat marți, 2 decembrie 2025, la Institutul Franței din București.

Teodora Barbălată este cercetătoare postdoctorală în biologie, în cadrul Departamentului Lipidomică, Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”. Proiectul ei își propune identificarea unei metode țintite de tratament pentru boala ficatului gras non-alcoolic, o afecțiune cu incidență din ce în ce mai crescută, dar care nu beneficiază încă de un tratament specific. Proiectul este intitulat *siRNA inhibition of long non-coding RNAs and CRISPR/dCas9-induced overexpression of endogenous genes; a new therapeutic approach for treating non-alcoholic fatty liver disease*.

Mădălina Gheţu este doctorand și asistent de cercetare în cadrul Departamentului de Inginerie Celulară şi Tisulară, Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”. În proiectul ei urmărește dezvoltarea unor noi strategii terapeutice utilizabile în fibroza cardiacă pentru care, actualmente, nu există tratament specific. Titlul proiectul său este *Innovative Antifibrotic Strategies: Evaluating Nanoformulated Natural Compounds in Human Cardiac Organoids*. Ea își propune să utilizeze nanoformulări în care va îngloba compuși naturali cu potențial antifibrotic și, ulterior, îi va testa pe modele de inimă în miniatură (organoizi), o alternativă la modelele experimentale animale.

De-a lungul edițiilor, Bursa L’Oréal-UNESCO „Pentru Femeile din Ştiinţă” a mai fost acordată următoarelor cercetătoare din cadrul Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” al Academiei Române: acad. Maya Simionescu (2001), Elena Butoi (2011), Monica Ţucurescu (2018) și Raluca Ţuțuianu (2022). Precizăm că acad. Maya Simionescu a fost distinsă în 2001 cu premiul special *UNESCO – L’Oreal Special Honor Award for Women in Science*.

Anul acesta, L’Oréal România a acordat 10 burse, fiecare în valoare de 10.000 de euro. La această ediție aproximativ 80 de candidate au aplicat în cadrul programului, dosarele fiind evaluate de un juriu format din academicieni, profesori universitari și doctori din cele trei arii de cercetare vizate, științele vieții, științele fizice și informatică.

Programul național de burse private L’Oréal – UNESCO „Pentru Femeile din Știință” a fost lansat în România în 2009.

For Women
in Science
unesco
FONDATION
L'ORÉAL

entru Femeile
din Științe
unesco
FONDATION
L'ORÉAL
În parteneriat cu
unesco
UEFISCDI

For Women
in Science
unesco
FONDATION
L'ORÉAL

TEODORA BARBĂLATĂ
MĂDĂLINA DIEȚU

11 decembrie 2025

Acad. Maya Simionescu,

Doctor Honoris Causa al Universității de Medicină, Farmacie, Științe și Tehnologie

din Târgu Mureș

Academician Maya Simionescu, Președinta Secției de Științe Biologice a Academiei Române, personalitate marcantă a cercetării biologiei celulare din România și cercetător cu un bogat palmares științific internațional, a primit joi, 11 decembrie 2025, titlul Doctor Honoris Causa acordat de Universitatea de Medicină, Farmacie, Științe și Tehologie „George Emil Palade" din Târgu Mureș.

Prof. dr. Leonard Azamfirei, rectorul UMFST, a subliniat că universitatea din Târgu Mureș își datorează numele inițiativei Acad. Maya Simionescu, care a colaborat îndeaproape cu celebrul profesor George Emil Palade, laureat al Premiului Nobel: „În fiecare an, cu ocazia Zilelor Universității, acordăm titlul de Doctor Honoris Causa unei personalități care s-a remarcat într-un mod deosebit la nivel mondial, în ceea ce privește știința, cultura (...) și într-un mod obligatoriu aceste persoane trebuie să fi făcut ceva de-a lungul timpului, ceva consistent pentru Universitate.

În acest an, decizia Senatului Universității a fost ca doamna Academician Maya Simionescu să primească această distincție onorantă. Faptul că această Universitate de Medicină, Farmacie, Științe și Tehnologie poartă numele savantului de origine română, George Emil Palade, i se datorează."

Laudatio a fost rostit de prof. univ. Anca Sim, care a scos în evidență faptul că acad. Maya Simionescu „este o personalitate remarcabilă și complexă, un ilustru om de știință, adevărat simbol al datoriei împinite pe drumul desăvârșirii și al perfecțiunii (....), clasată pe primul loc în topul «Best Scientists – 200 de personalități din domeniul biologiei și biochimiei»".

În partea a doua a ceremoniei, acad. Maya Simionescu a acordat răspunsul de mulțumire, încheiat cu o caldă pledoarie pentru dezvoltarea cercetării științifice și pentru munca de echipă: „Cercetarea este una dintre aventurile cele mai frumoase ale spiritului uman – un Everest al cunoașterii, o aventură de echipă, fără limite, fără bariere; este un drum infinit, precum Coloana lui Brâncuși, un drum spre cunoaștere. Câte unul dintre noi ajunge în vârf. Vârful este simbolul recunoașterii. Dar adevărata bucurie se află în ascensiunea comună, în drumul către culmi, presărat și cu tristețea nereușitelor, dar și bucuria succesului. Cercetarea este Everestul spiritului uman, o aventură unde îmi place să cred că imposibilul nu există".

ZILELE UMFST 2025
Z.I.G.E. PALADE TÂRGU MUREȘ
8-13 DECEMBRIE

UMFST 2025
DECERNAREA TITLULUI ONORIFIC DE DOCTOR HONORIS CAUSA
DECERNAREA DIPLOMEI DE ONOARE „DR. PETRE MUSCĂ”

Academia Romana

Institutul de Biologie si Patologie Celulara „Nicolae Simionescu”

TEZA DE DOCTORAT

STUDIUL PLASTICITATII CELULELOR STEM FETALE CU POTENTIAL TERAPEUTIC

Conducător de doctorat:

Acad. Maya Simionescu

Doctorand:

Andrei Constantinescu

Bucuresti, 2013

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

I. INTRODUCERE

II. STADIUL ACTUAL AL CUNOASTERII

Capitolul 1. Celulele stem si terapia celulara

1.1. Celulele stem

1.1.a. Tipuri de celule stem

1.1.b. Rolul celulelor stem

1.1.c. Importanta celulelor stem

1.2. Diferentierea celulelor stem

1.1.a. Celulele totipotente

1.1.b. Celulele pluripotente

1.1.c. Celulele multipotente hematopoietice

1.1.d. Celulele multipotente mezenchimale

1.1.e. Celulele oligopotente

1.1.f. Celulele unipotente

1.1.g. Celulele cu pluripotenta indusa

Capitolul 2. Surse de celule stem

2.1. Celule stem embrionare

2.2. Celule stem fetale

2.3. Celule stem adulte

Capitolul 3. Utilizarea celulelor stem

3.1. Celulele stem in cercetarea fundamentala

3.2. Celulele stem in cercetarea farmacologica

3.3. Aplicatii terapeutice ale celulelor stem

III. CONTRIBUTIA ORIGINALA

Capitolul 1. Evaluarea potentialului de recelularizare vasculara al celulelor stem fetale izolate din gelatina Wharton

1.1. Introducere

1.2. Obiective

1.3. Metodologie si rezultate

1.3.1. Izolarea si caracterizarea celulelor stem din gelatina Wharton

1.3.1.a. Izolarea celulelor stem

1.3.1.b. Imunofenotiparea celulelor stem

1.3.2. Diferentierea si caracterizarea celulelor stem din gelatina Wharton
1.3.2.a. Diferentierea catre linia endoteliala a celulelor mezenchimale
1.3.2.b. Imunofenotiparea celulelor endoteliale progenitoare
1.3.3. Izolarea si prelucrarea arterelor din cordonul ombilical
1.3.3.a. Izolarea arterelor
1.3.3.b. Decelularizarea arterelor
1.3.4. Evaluarea potentialului de recelularizara vasculara
1.3.4.a. Obtinerea co-culturilor celule-tesut vascular
1.3.4.b. Analiza histologica
1.3.4.c. Analiza prin microscopie de fluorescenta
1.3.4.d. Evaluare imunofenotipica
1.4. Discutii si concluzii
Capitolul 2. Caracterizarea si evaluarea potentialului terapeutic al celulelor din lichidul amniotic
2.1. Introducere
2.2. Obiective
2.3. Metodologie si rezultate
2.3.1. Caracterizarea celulelor din lichidul amniotic
2.3.1.a. Caracterizarea morfologica
2.3.1.b. Analiza ultrastructurala
2.3.1.c. Imunofentoparea celulelor mezenchimale
2.3.1.d. Profilul transcriptomic al celulelor mezenchimale
2.3.2. Diferentirea celulelor stem din lichidul amniotic
2.3.2.a. Diferentierea celulelor stem catre linia endoteliala
2.3.2.b. Analiza ultrastructurala a celulelor endoteliale
2.3.2.c. Imunofenotiparea celulelor endoteliale
2.3.3. Sortarea celulelor CD117 pozitive din lichidul amniotic
2.3.3.a. Sortarea prin citometrie de flux
2.3.3.b. Analiza morfologica a celulelor CD117 pozitive sortate
2.3.3.c. Analiza imunofenotipica a celulelor stem sortate
2.4. Discutii si concluzii
IV. CONCLUZII GENERALE
V. PERSPECTIVE
VI. REFERINTE BIBLIOGRAFICE

CUVINTE CHEIE

Celule stem fetale

Celule stem mezenchimale

Glatina Wharton

Lichid amniotic

Tesut fetal uman vascular

Diferentiere celulara

Celule endoteliale progenitoare

Recelularizare vasculara

Citometrie de flux

Sortare celulara

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Scopul acestei lucrari a fost atat evidentierea plasticitatii celulelor stem mezenchimale din surse fetale cat si evaluarea potentialului terapeutic al celulelor stem fetale si implicatiile acestora in medicina regenerativa. Astfel, am dorit sa investigam capacitatea de diferentiere a celulelor mezenchimale izolate din gelatina Wharton catre celule endoteliale progenitoare si sa evaluam potentialul de regenerare tisulara cardiovasculara al acestora. In acest scop ne-am propus sa stabilim un model *in vitro* bazat pe tesut vascular fetal uman pornind de la arterele din cordonul ombilical in vederea investigarii potentialului de recelularizare al celulelor endoteliale progenitoare deiferentiate din celule stem mezenchimale fetale.

Totodata, am dorit sa investigam plasticitatea celulelor stem mezenchimale din lichidul amniotic prin analiza aprofundata a capacitatii acestora de a se diferentia in celule endoteliale progenitoare in vederea evaluarii potentialului terapeutic. In acest scop am dorit sa investigam atat imunofenotipul cat si profilul transcriptomic al celulelor mezenchimale din lichidul amniotic dar si detaliile ultrastructurale ale celulelor endoteliale diferentiate din celulele mezenchimale din lichidul amniotic.

Teza este structurata in doua parti. Prima parte, **Studiul actual al cunoasterii** este organizata in 3 capitole in care sunt descrise aspecte legate de celulele stem (Capitolul 1 din *Studiul actual al cunoasterii*), precum ierarhizarea celulelor stem si rolul lor (Capitolul 1.1 din *Studiul actual al cunoasterii)* cat si capacitatea acestora de a se diferentia (Capitolul 1.2 din *Studiul actual al cunoasterii*). Urmeaza o descriere a tipurilor de celule in functie de sursa din care sunt obtinute acestea cat si o trecere in revista metodelor de izolare (Capitolul 2 din *Studiul actual al cunoasterii*), iar in ultimul capitol este detaliata utilizare celulelor stem atat in cercetarea fundamentala si in cercetarea farmacologica cat si in medicina regenerativa (Capitolul 3 din *Studiul actual al cunoasterii*).

In cea de-a doua parte a lucrarii, **Contributia originala** studiile au fost structurate in doua capitole. In vederea evaluarii potentialului de recelularizare vasculara al celulelor stem fetale izolate din gelatina Wharton (Capitolul 1 din *Contributia originala*) am urmarit izolarea, caracterizarea si diferetierea celulelor mezenchimale din gelatina Wharton catre o linie endoteliala si stabilirea unui model *in vitro* bazat pe tesut vascular fetal uman pornind de la arterele din cordonul ombilical. Astfel am dorit sa investigam potentialul de recelularizare al celulelor endoteliale progenitoare atat la nivel histologic cat si la nivel imunofenotipic.

Rezultatele obtinute demonstreaza capacitatea celulelor stem mezenchimale din gelatina Wharton de a se diferentia catre celule endoteliale progenitoarea cu un real potential terapetutic in regenerarea vasculara. Aceste celule ar putea avea un impact major in medicina regenerativa datorita imunogenicitatii scazute si potentialului terpeutic.

In studiul privind evaluarea plasticitatii si potentialului terapeutic al celulelor din lichidul amniotic (Capitolul 2 din *Contributia originala*) am urmarit realizarea unei caracterizari complete a acestor celule, la nivel imunofenotipic, ultrastructural si molecular. In acest scop am utilizat citometria de flux pentru investigarea makerilor de suprafata, microscopia electronica si tehnica de real-time PCR (Capitolul 2.3.1 din *Contributia originala*). In acelasi timp, am dorit sa evaluam potentialul de diferentiere al celulelor din lichidul amniotic prin inducerea diferentierii catre celule endoteliale (Capitolul 2.3.2 din *Contributia originala*). Deasemenea, am urmarit stabilirea fenotipului celulelor stem CD117 pozitive din lichidul amniotic prin sortarea acestora si analiza imunofenotipica a culturilor de celule CD117 pozitive obtinute (Capitolul 2.3.3 din *Contributia originala*).

Rezultatele obtinute demonstreaza capacitatea celulelor din lichidul amniotic de a se diferentia in celule endoteliale mature prin prezenta markerilor de suprafata specifici acestor celule, dar si prin prezenta structurilor intracelulare specifice precum veziculele plasmalemale si corpusculii Weibel-Palade. Mai mult decat atat am observat diferentele imunofenotipice ale celulelor CD117 pozitive din populatia heterogena de celule din lichid in vederea stabilirii relatiilor dintre celulele CD117 pozitive si CD117 negative in cadrul populatiei heterogene.

In concluzie, in ceea ce priveste potentialul regenerativ al celulelor izolate din gelatina Wharton, rezultatele noastre au demonstrat ca arterele decelularizate din cordon ombilical uman pot fi utilizate ca matrici acelulare si reprezinta un bun model experimental *in vitro*. Am demonstrat ca EPC-urile diferentiate din MSC-uri din gelatina Wharton pot repopula tesutul vascular lezat/decelularizat evidentiat de expresia markerilor specifici fenotipului endotelial CD31+/CD34+/CD105+/CD133+ la nivelul arterelor recelularizate. Datele de histologie si citometrie de flux obtinute sugereaza ca EPC-urile diferentiate din MSC-uri de origine fetala au un intalt potential terapeutic, prin capacitatea acestora de repopulare a vaselor de sange lezate/decelularizate.

In ceea ce priveste celulele izolate din lichidul amniotic, putem concluziona ca aceste prezinta un imunofenotip specific celulelor stem mezenchimale prin exprimarea markerilor CD29, CD90 si CD73. Imunofenotipul CD29+/CD90+/CD105+/CD133+/CD146+ al acestor celule, ne sugereaza prezenta unor markeri specifici si altor tipuri de celule, precum CD105

specific celulelor endoteliale si CD133 prezent pe suprafata celulelor stem hematopoietice si a celulelor endoteliale progenitoare. In ciuda capacitatii foarte ridicate de proliferare a celulelor din lichidul amniotic, imunofenotipul acestore se modifica dupa 10 zile in cultura, devenind CD29+/CD90-/CD105-/CD133-/CD146+. La nivel molecular AFC-urile prezinta atat markeri de celule stem mezenchimale, precum ACAN, BGLAP, COL2A1 si PPARG, cat si markeri transcriptomici specifici celulelor stem embrionare cum ar fi OCT4, REX1 sau SOX2. Interesant de notat este prezenta unor markeri specifici celulelor stem hematopoietice precum CD3D, CD4, CD8A sau MME si a unor markeri specifici celulelor stem neurale cum ar fi NCAM1, SIGMAR1 si S100B. Aceste rezultate ne conduc spre ipoteza prezentei unui numar limitat de markeri specifici tuturor liniilor celulare la nivelul celulelor stem. Acest fenomen ar putea fi corelat cu potentialul de diferentiere, ca rapuns la stimuli externi prin existenta unor molecule “primer” care conduc diferentierea in functie de stimului aplicat.

Totodata, AFC-urile prezinta capacitatea de diferentierea catre linia endoteliala. Aceste se pot diferentia in celule cu imunofenotip specific celulelor endoteliale mature asa cum a fost demonstrat prin tehnica citometriei de flux, de prezenta markerilor endoteliali CD31, CD105 si CD144. Un element de noutate important il reprezinta analiza ultrastructurala a AFC-urilor diferentiate care a demonstrat prezenta structurilor intracelulare specifice celulelor endoteliale precum veziculele plasmalemale si corpusculii Weibel-Palade. Astfel, aceste celule nu au capacitatea doar de a fi ghidate catre o linie endoteliale, ci pot deveni chiar celule endoteliale mature cu structurile necesare unei posibile indepliniri a functiilor acestora, cum ar fi de exemplu veziculele plasmalemale care ar putea fi implicate in procesele de transcitoza.

Ca **perpective** de viitor dorim sa investigam capacitatea celulelor din lichidul amniotic de a repopula vase de sange lezate/decelularizate. In plus ne propunem sa utilizam celulele stem CD117 pozitive in co-cultura cu celule endoteliale progenitoare izolate din sangele din cordonul ombilical pentru a investiga efectul regenerativ al acetora fara utilizare factorilor de crestere si a diferentierii *in vitro*, pentru a sustine o posibila strategie terapeutica cu aplicabilitate clinica.

SCIENTIFIC REPORT

Project title: Impact of high glucose in valvular endothelial cells-monocyte crosstalk: molecular signatures and role in early valvular dysfunction
Acronym: VALDYSIGN
Phase 1: Characterization of the molecular profile induced by short-term exposure to diabetic conditions in the VEC-monocyte interaction (part I)
Implementation period: 01.04.2022-31.12.2022

Activity 1.1: Sequencing the entire transcriptome to identify molecules involved in the early changes induced in VEC-monocyte interactions under diabetic conditions.
Activity 1.2: Validation of key molecules through Real Time PCR.

SUMMARY OF PHASE 1: Aortic valve disease (AVD) and diabetes are progressive diseases that represent global health problems. Diabetes is a risk factor for AVD, predicts a faster disease progression, and accelerates AVD. The early mechanisms of aortic valve dysfunction are still unclear, but valvular endothelial cells (VEC) and monocytes (Mo) play key roles in this process. The mechanisms by which diabetes contributes to early valve dysfunction are not yet well known, so our hypothesis is that high glucose alters the normal interaction of valvular endothelial cells with monocytes, inducing progressive molecular changes, phenotypic changes, and functional alterations in both cell types. The aim of the VALDYSIGN project is to highlight the modified molecules in VEC and Mo in their communication under HG conditions, to evaluate the role of key molecules in cell dysfunction, and to propose new mechanisms of early valvular dysfunction in diabetes.
In the first phase of the VALDYSIGN project, the molecular profile induced by short-term exposure to high glucose in the VEC-Mo interaction was characterized by sequencing the entire transcriptome of both cell types. Differentially expressed genes (DEGs) in different experimental conditions were functionally analyzed by association with available KEGG maps in databases. In VEC interacting with Mo under conditions of high glucose, molecules involved in focal adhesions, tight junctions, adherens junctions, cellular adhesion molecules, matrix-receptor interactions, cytoskeleton regulation and endothelial transmigration were identified, suggesting changes in endothelial permeability and cellular cytoskeleton changes. In addition, molecules involved in matrix-receptor interactions, transendothelial migration, cellular adhesion molecules, and signaling pathways TLR, NF-kB, JAK-STAT, TNFα and chemokines, suggesting increased monocytic adhesion and transmigration to the endothelium and an inflammatory phenotype, were identified in Mo interacting with VEC under high glucose conditions. These data suggest that early exposure to high glucose induces progressive molecular and phenotypic changes in both cell types, contributing to valvular dysfunction in diabetes.

DISSEMINATION: Participation at the XXXIX Annual Scientific Session of the Romanian Society of Cell Biology, October 21-23, 2022, Cluj-Napoca, Romania – MOLECULAR SIGNATURES OF

VALVULAR ENDOTHELIAL CELLS AND MONOCYTES CROSS-TALK IN EARLY DIABETIC CONDITIONS.
Monica Tucureanu, Letitia Ciortan, Ileana Manduteanu – poster.

SCIENTIFIC REPORT

Project title: Impact of high glucose in valvular endothelial cells-monocyte crosstalk: molecular signatures and role in early valvular dysfunction
Acronym: VALDYSIGN
Phase 2: Characterization of the molecular profile induced by short-term exposure to diabetic conditions in the VEC-monocyte interaction (part II); Evaluation of the function of relevant molecules found to be modified in endothelial permeability and monocyte adhesion and transmigration (part I).
Implementation period: 01.01.2023-31.12.2023
Activity 2.1: Investigation of protein expression of relevant molecules induced by high glucose in VEC-monocyte co-culture;
Activity 2.2: Investigation of endothelial permeability under high glucose conditions: the role of modified expression of junctional and cytoskeletal proteins;
Activity 2.3: Establishing the role of diabetes in monocyte adhesion and transmigration under dynamic conditions.

SUMMARY OF PHASE 2

Valvular endothelium represents an important protective barrier against metabolic, mechanical, and inflammatory aggression and is believed to play a role in valvular homeostasis and interactions with circulating blood cells and molecules. Regulation of endothelial barrier function is orchestrated by the quantity and arrangement of intercellular junctions, particularly adherens and tight junctions, of actin cytoskeleton organization and focal adhesions. Together, these elements govern tissue permeability. There is evidence that the phenotype of valvular endothelial cells (VEC) is progressively modified in diabetes, but the specific mechanisms by which diabetes contributes to early endothelial dysfunction remain incompletely elucidated. However, it is certain that both VEC and monocytes (Mo) play an important role and the diabetic environment perturbs cellular homeostasis. Therefore, the hypothesis of our study is that the interaction between monocytes and VEC under diabetic conditions triggers molecular modifications that lead to impairment of endothelial integrity and induction of monocyte adhesion and transmigration. The objective of this study is to establish the molecular signatures of VEC after their brief interaction with monocytes under high glucose conditions and to propose new mechanisms underlying early valvular dysfunction in diabetes.
In the second phase of the VALDYSIGN project, the gene and protein expression of modified molecules in VEC by interaction with monocytes under high glucose conditions were investigated, targeting the molecules involved in cell-ECM and cell-cell interactions, cell adhesion, and cytoskeleton regulation (pathways identified by VEC transcriptome sequencing analysis). The results showed that the interaction between VEC and monocytes under high glucose conditions modifies focal adhesions by decreasing focal adhesion kinase phosphorylation, reducing paxillin expression, vinculin internalization, and decreasing the expression of integrins that function as ECM receptors. In addition, VEC-monocyte interaction under high glucose conditions activates PI3K and RhoA-ROCK1 signaling pathways, reduces intercellular junctions by decreasing cadherin-2, increases E-selectin expression, and α4 integrin expression on the cell surface.
Since our study identified modifications of molecules involved in cell-cell and cell-ECM interactions, we investigated the functional role of these modifications in cellular permeability.

Our data showed that valvular endothelium permeability increases in interaction with monocytes under high glucose, compared to VEC maintained in culture medium with normal glucose concentration. Moreover, VEC interacting with monocytes under high glucose conditions are less adhesive to collagen I, fibronectin, and vitronectin, corresponding to observations on integrin expression. Also, our data suggest that increased glucose levels lead to increased monocyte adhesion and transmigration, which may contribute to the progression of aortic valve lesions.

DISSEMINATION

The results obtained in Phase 2 of the VALDYSIGN project were disseminated at two international conferences:

- Oral presentation: Bioinformatic analysis of molecular mechanisms underlying the aortic valvular dysfunction in diabetes. Monica Tucureanu. Participation in the "Crossing bridges between bioinformatics and clinical research - Genetoberfest GO2023" conference, from 16-19 October 2023, Munich, Germany;
- Poster: Molecular mechanisms underlying the aortic valvular dysfunction in diabetes. Monica Tucureanu, Letitia Ciortan, Razvan Macarie, Andreea Mihaila, Elena Butoi, Ileana Manduteanu. Participation in the 44th ANNUAL SCIENTIFIC SYMPOSIUM OF THE INSTITUTE OF CELLULAR BIOLOGY AND PATHOLOGY "NICOLAE SIMIONESCU" held jointly with the 40th ANNUAL SCIENTIFIC SESSION OF THE ROMANIAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY, from 16-17 November 2023, Bucharest, Romania.

SCIENTIFIC REPORT

Project title: Impact of high glucose in valvular endothelial cells-monocyte crosstalk: molecular signatures and role in early valvular dysfunction
Acronym: VALDYSIGN
Phase 3: Evaluation of the function of relevant molecules found to be modified in endothelial permeability and monocyte adhesion and transmigration (part II).
Implementation period: 01.01.2024-31.05.2024
Activity 2.3: Establishing the role of diabetes in monocyte adhesion and transmigration under dynamic conditions.

SUMMARY OF PHASE 3

In this study, our results reveal that the interaction between VEC and monocytes under normal or diabetic conditions has a significant impact on the transcriptomic profile of VEC. Specific molecular changes were identified in processes associated with cytoskeleton regulation, focal adhesion, cell junctions, and cell adhesion molecules. Exposure of VEC to increased glucose concentration led to changes in key molecules and regulatory proteins, such as increased expression of VASP and ROCK1 (involved in cytoskeleton regulation), increased expression of JAM2, cadherin-2, and integrins α4, α5 and β2 (involved in intercellular adhesion and cell-matrix interactions), and decreased expression of paxillin (an adaptive protein in focal adhesions). Additionally, the interaction between VEC and monocytes under normal glucose conditions resulted in increased expression of VASP, ROCK1, integrin β2, and PI3K activation, as well as decreased expression of proteins involved in focal adhesions (FAK and paxillin) and junctional proteins (claudin-5 and cadherin-5). In conditions of increased glucose, this interaction induced PI3K signaling pathway activation, decreased expression of junctional proteins (FAK, caveolin-1, and paxillin), and increased expression of E-selectin. Moreover, the interaction under high glucose conditions highlighted decreased expression of integrins α1, α5, αV, αVβ5, α5β1 and cadherin-2. These changes led to cytoskeleton disorganization, junctional complex alterations, decreased VEC adhesion to extracellular matrix proteins, increased permeability, and increased monocyte adhesion and transmigration, suggesting the alteration of the valvular endothelium's barrier function.
To determine the mechanisms involved in regulating the barrier function, we used Y27623 and LY294002 inhibitors for ROCK and PI3K pathways, identified as activated under diabetic conditions or after monocyte interaction. ROCK and PI3K signaling pathways were identified as activated in VEC under diabetic conditions or after interaction with monocytes. The results show the partial involvement of these signaling pathways in cytoskeleton regulation, regulation of focal adhesion formation or disassembly, intercellular junction regulation, and regulation of cell adhesion molecule expression. Furthermore, PI3K was shown to be involved in regulating endothelial permeability. All of these findings demonstrate that both ROCK and PI3K play an important role in regulating mechanisms induced by increased glucose in the monocyte-VEC interaction and can be potential therapeutic targets in aortic valve disease associated with diabetes.

DISSEMINATION

Publication of a scientific article in an ISI journal - The Specific Molecular Changes Induced

by Diabetic Conditions in Valvular Endothelial Cells and upon Their Interactions with Monocytes Contribute to Endothelial Dysfunction. Monica Madalina Tucureanu, Letitia Ciortan, Razvan Daniel Macarie, Andreea Cristina Mihaila, Ionel Droc, Elena Butoi and Ileana Manduteanu. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25,3048. https://doi.org/10.3390/ijms25053048; published on March 6, 2024.

INTERNATIONAL CONFERENCE

under the aegis of the **ROMANIAN ACADEMY**

THE 42nd ANNIVERSARY SYMPOSIUM OF THE INSTITUTE OF CELLULAR BIOLOGY AND PATHOLOGY "NICOLAE SIMIONESCU"

held jointly with

THE 38th ANNUAL SCIENTIFIC SESSION OF THE ROMANIAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

"From basic cell biology to personalized medicine during Covid-19 pandemic; creativity and vision in a rapidly changing world"

November 4-6, 2021

VIRTUAL EVENT

Thursday - November 4, 2021	
OPENING OF THE CONFERENCE **9.30 – 9.45** Acad. Maya Simionescu – Director ICBP-NS and President RSCB Acad. Ioan-Aurel Pop – President of the Romanian Academy Prof. Dr. Adrian Curaj – Director of UEFISCDI	
	SESSION 1 **ICBP-NS CONFRONTING THE SARS-CoV-2 PANDEMIC ERA** **Chair: Maya Simionescu** **9.45 - 12.00**
	Maya Simionescu (Director) Uncovering the cell's secrets - a continuous quest of our team **Ileana Manduteanu** (Dept. of Biopathology and Therapy of Inflammation) Mechanisms and novel therapies for aortic valve disease in diabetes **Manuela Calin** (Lab. of Medical and Pharmaceutical Bionanotechnologies) Targeted therapies based on nanocarriers to reduce vascular inflammation **Anca Sima** (Dept. of Lipidomics) In search for new biomarkers for cardiovascular diseases - dysfunctional HDL and epigenetic factors (miRNAs). **Felicia Antohe** (Dept. of Proteomics) Moving forward towards proteomics-based precision medicine in non-communicable diseases **Anca Gafencu** (Lab. of Gene Regulation and Molecular Therapies) Cellular and molecular manipulations for therapeutic purposes **Alexandrina Burlacu** (Lab. of Stem Cell Biology) Harnessing the power of MSC to attenuate the damaging effects of aging, autoimmune diseases and myocardial infarction

	Adrian Manea (Molecular and Cellular Pharmacology - Functional Genomics Laboratory) Epigenetic mechanisms in cardiometabolic disorders: potential biomarkers and therapeutic targets **Irina Titorencu** (Cell and Tissue Engineering Laboratory) Mesenchymal stromal cells: therapeutic potential for skin wound healing
12.00 - 12.30	**Coffee break**
	SESSION 2 **SARS-CoV-2 – INFECTION / INVASIVENESS / VACCINE** **12.30 – 14.00*** **Chair: Maya Simionescu** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
12.30 - 12.50	**Maya Simionescu**, ICBP-NS Dangerous encounters: SARS-CoV-2 - epithelial/ endothelial cell (Intalniri periculoase: SARS-CoV-2 - celula epiteliala/ endoteliala)
12.50 - 13.20	**Victor Voicu**, Vice-President of the Romanian Academy Neuroinvazia virusului SARS-CoV-2, simptomatologie, cai de patrundere si mecanisme patogenice (Neuroinvasion of SARS-CoV-2 virus, symptomatology, penetration routes and pathogenic mechanisms)
13.20 - 13.35	**Gafincu Grigoriu Daniel- Ionut,** "Grigore T. Popa" University of Medicine, Iasi, Romania SARS-CoV-2 UVC inactivation-mechanisms and a new air decontamination equipment
	Fikadu Tafesse, Oregon Health and Science University, USA Vaccine and natural infection elicited COVID-19 immunity against SARS-CoV-2 variants *(This talk will be given at the end of the Session 4)*
13.35 – 14.30	**Lunch and poster session**

	SESSION 3 **NON-COMMUNICABLE DISEASES: ATHEROSCLEROSIS AND DIABETES** **14.30 – 16.25*** **Chairs: Anca Sima, Maria Dorobantu** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
14.30 – 14.55	**Maria Dorobantu,** Floreasca Clinical Emergency Hospital, Bucharest, Romania Genetic aspects in hypertrophic cardiomyopathy: what is new?
14.55 – 15.15	**Camelia Stancu,** ICBP-NS New biomarkers for risk stratification in peripheral artery disease patients – proteins of dysfunctional HDL
15.15 – 15.30	**Viorel Suica,** ICBP-NS Cardiac alarmins as indicators of the efficacy of hypolipidemic treatment in experimental hyperlipidemia
15.30-15.45	**Laura Toma,** ICBP-NS Endothelial dysfunction in diabetes is aggravated by glycated lipoproteins; novel molecular therapies
15.45 – 16.00	**Violeta Trusca,** ICBP-NS Understanding the apolipoprotein E gene regulation, a key step toward the development of novel therapies for atherosclerosis
16.00 – 16.25	**Anca Dobrian,** Eastern Virginia Medical School, USA Learning to listen: understanding extracellular vesicle chatter in obesity co-morbidities
16.25 – 17.00	Coffee break
	SESSION 4 - PhD STUDENTS' PRESENTATIONS **NON-COMMUNICABLE DISEASES: ATHEROSCLEROSIS, DIABETES AND CANCER** **17.00 – 18.10*** **Chairs: Alexandrina Burlacu, Carmen Cotrutz** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
17.00 - 17.10	**Vasile Grecu,** "Grigore T. Popa" Univ. of Medicine, Iasi, Romania The importance of determining and corelating the expression of VEGFR-1, CD4, and CD8 in the evaluation of acute rejection of cardiac allografts – correlative immunohistochemical study

17.10 – 17.20	**Teodora Barbalata**, ICBP-NS MicroRNAs profiling in the heart and liver of high-fat diet induced hyperlipidemic hamster
17.20 - 17.30	**Alexandra Lazar**, ICBP-NS Activation of histone acetyltransferase p300/CBP - dependent signalling pathways induces oxidative stress, inflammation, and fibrosis in the kidney of diabetic mice
17.30 – 17.40	**Evelyn Rusu**, ICBP-NS MiRNAs generated from Meg3-Mirg locus are downregulated during aging
17.40 – 17.50	**Ioana Karla Comarita**, ICBP-NS Therapeutic potential of stem cell- derived extracellular vesicles on atherosclerosis-induced vascular dysfunction
17.50 - 18.00	**Maria Anghelache**, ICBP-NS Preparation and characterization of macrophage-membrane-coated nanoemulsions for delivery of specialized pro-resolving lipid mediators of inflammation
18.00 – 18.10	**Botezatu Ionut Catalin**, "Grigore T. Popa" Univ. of Medicine, Iasi Expression of MT1-MMP and CD147 in gingival tissue of patients with diabetes mellitus-corelative immunohistochemical study

Friday - November 5, 2021	
	SESSION 5 **CELLULAR DYNAMICS IN DISTRESS AND DISEASE** **9.30 – 11.05*** **Chair: Anca Gafencu** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
09.30 - 10.00	**Stefan Constantinescu**, Catholic Univ. of Louvain, Belgium Clonal hematopoietic driver and epigenetic mutations in myeloid cancers: relevance beyond hematology
10.00 - 10.25	**Shlomo Sasson**, The Hebrew University of Jerusalem, Israel Monounsaturated fatty acids protect insulin-secreting beta cells against free fatty acid-induced cytotoxicity

10.25 - 10.50	**Simona Chera,** University of Bergen, Norway Mapping islet cell interconversion phenomena
10.50 - 11.05	**Mirel Adrian Popa,** ICBP-NS The role of FGFR2 signalling in modulating MMP/TIMP balance in cardiac myofibroblasts
11.05 – 11.30	**Coffee break**
	SESSION 6 **THE ANNUAL GENERAL MEETING OF RSCB MEMBERS - REPORTS OF THE PRESIDENTS OF THE SOCIETY BRANCHES** **11.30 – 13.00** **Chair: Maya Simionescu**
	Antoaneta Chesca, President RSCB - Brasov Branch **Carmen- Elena Cotrutz,** President RSCB - Iasi Branch **Anca Hermenean,** President RSCB - Arad Branch **Catalina Pisoschi,** President RSCB - Craiova Branch **Daciana Sava,** President RSCB - Constanta Branch **Anca Ileana Sin,** President RSCB - Targu Mures Branch **Doina Verdes,** President RSCB - Timisoara Branch **TBA,** President RSCB - Cluj Branch **Maria Tolbaru,** Accountant of RSCB
13.00 – 13.40	**Lunch and poster session**
	SESSION 7 **PhD STUDENTS' PRESENTATIONS** **CELLS AND CELLULAR DERIVATIVES IN THERAPY** **13.40 – 15.10*** **Chairs: Felicia Antohe, Anca Hermenean** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
13.40 - 13.50	**Daniela-Madalina Iacomi,** ICBP-NS Generation and characterization of an immortalized human adipose-derived mesenchymal stromal cell line
13.50 - 14.00	**Laura Maria Daian**, ICBP-NS Living under stress - Evaluating changes in β cells homeostasis

14.00 - 14.10	**Aurel Cerveanu –Hogas,** ICBP-NS Use of exosomal protein cargo for the prediction and management of gestational diabetes mellitus
14.10 - 14.20	**Raluca Tutuianu**, ICBP-NS Human mesenchymal stromal cells - derived exosomes promote skin wound healing; mechanisms involved
14.20 – 14.30	**Cristina-Andreea Mihaila,** ICBP-NS Polarized N1 and N2 neutrophils acquire distinct phenotypes and functions
14.30 – 14.40	**Neli Olah,** "Vasile Goldis" Western University of Arad, Romania Morpho-anatomical and phytochemical study of the Corylus L. species (buds)
14.40 - 14.50	**Rebeca Simona Ignat,** University of Bucharest Antifibrotic effects of Corylus avellana gemmotherapic extract reinforced with chrysin/cyclodextrin nanocomplexes on hepatic stellate cells
14.50 - 15.00	**Letitia Ciortan**, ICBP-NS High glucose induced changes in valvular endothelial cells phenotype in a 3D model of aortic valve disease
15.00 – 15.10	**Geanina Voicu,** ICBP-NS VCAM-1 targeted lipopolyplexes carrying Runx2-shRNA mitigate the osteodifferentiation of 3D-cultured human valvular interstitial cells
15.10 – 15.40	**Coffee break**
	SESSION 8 **CARDIOMYOPATHY, INFLAMMATION-RESOLUTION, ATHEROSCLEROSIS** **15.40 – 17.25*** **Chairs: Elena Butoi, Carmen Cotrutz** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
15.40 – 16.05	**Alexandru Schiopu**, Lund University, Sweden The S100A8/A9 alarmin as potential treatment target in inflammatory cardiomyopathies

16.05 – 16.30	**Maria Consiglia Trotta,** "Luigi Vanvitelli" Univ. of Campania, Italy Resolvin D1 actions in ocular pathologies
16.30 – 16.55	**Elena Butoi,** ICBP-NS Polarized neutrophils: versatile players that orchestrate healing or heart failure after myocardial infarction
16.55 - 17.10	**Monica Tucureanu,** ICBP-NS Cellular and molecular mechanisms of complement proteins in human atherosclerotic plaque progression
17.10 - 17.25	**Loredan Nicolescu,** ICBP-NS Epigenetic biomarkers for peripheral artery disease
17.25 - 17.45	**Coffee break**
	SESSION 9 **GENERAL PATHOLOGY - CELLULAR AND MOLECULAR LEVEL** **17.45 – 18.50*** **Chair: Ileana Manduteanu** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
17.45 – 18.10	**Dan Simionescu,** Clemson University, USA Non surgical management of abdominal aortic aneurysms
18.10 – 18.35	**Florea Lupu,** Oklahoma Medical Research Foundation, USA Coagulopathy and endotheliopathy of bacterial and viral infections
18.35 – 18.50	**Doinita Temelie- Olinici,** "Grigore T. Popa" Univ. of Medicine, Iasi Ultrastructural characteristics of keratoachantoma – clinical implications

Saturday - November 6, 2021	
	SESSION 10 **INNOVATIVE THERAPIES, STEM CELLS** **9.30 - 11.05*** **Chair: Manuela Calin** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
9.30 – 9.55	**Manuela Calin,** ICBP-NS P-Selectin directed RAGE-shRNA nanocarriers reduce atherosclerosis-associated inflammation in ApoE-deficient mice
9.55 – 10.20	**Luiza Ghila,** University of Bergen, Norway Modelling pancreatic islet architecture using human induced pluripotent stem cells
10.20 – 10.45	**Ferenc Fenyvesi,** University of Debrecen, Hungary Application of cyclodextrins and calixarenes in the nanoformulations of bioactive compounds
10.45 – 11.05	**Bogdan Preda,** ICBP-NS Local microenvironment activates in vivo apoptosis of mesenchymal stromal cells after transplantation
11.05 – 11.30	**Coffee break**
	SESSION 11 **CELLULAR MODIFICATIONS UNDER STRESS** **11.30 – 13.30*** **Chairs: Gallia Butnaru, Larisa Andronic** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
11.30 – 11.55	**Larisa Andronic,** IGPPP Chisinau, Republic of Moldova Cells and biotic stress in plant virus-host systems
11.55 – 12.20	**Mihaela Corneanu**, USAMVB Timisoara, Romania Cyto and genotoxicity of soil and water pollutants

12.20- 12.45	**Tatiana Saltanovici,** IGPPP Chisinau, Republic of Moldova Associated influence of viral pathogens and high temperature on male tomato gametophyte
12.45 – 13.00	**Miruna Stan**, Faculty of Biology Bucharest In vitro research on the anti-cancer potential of some curcumin derivates
13.00 -13.15	**Ana Emanuela Botez,** "Grigore T. Popa" Univ. of Medicine, Iasi β–Defensin and COX-2 expression value in premalignant epithelial lesions: correlative immunohistochemical study
13.15 – 13.30	**Pavel Onofrei,** "Grigore T. Popa" Univ. of Medicine, Iasi Expression value of MMP-14 and EMMPRIN (CD 147) in benign prostatic hyperplasia – comparative immunohistochemical study
13.30 – 14.00	**Lunch and poster session**
	ROUND TABLE **CELLULAR MODIFICATIONS UNDER STRESS** **14.00 - 16.00** **Organiser: Gallia Butnaru**
	Larisa Andronic, IGPPP Chisinau **Mihaela Corneanu,** USAMVB Timisoara **Ioan Sarac,** USAMVB Timisoara **Sorina Popescu,** USAMVB Timisoara **Violeta Turcus,** USAMVB Timisoara **Diana Argherie,** USAMVB Timisoara **Cristina Popescu,** "Vasile Goldis" Western University of Arad **Viviane Bota,** "Vasile Goldis" Western University of Arad
16.00 – 16.30	**CLOSING REMARKS**

INTERNATIONAL CONFERENCE

under the aegis of the **ROMANIAN ACADEMY**

THE 42nd ANNIVERSARY SYMPOSIUM OF THE INSTITUTE OF CELLULAR BIOLOGY AND PATHOLOGY "NICOLAE SIMIONESCU"

held jointly with

THE 38th ANNUAL SCIENTIFIC SESSION OF THE ROMANIAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

"From basic cell biology to personalized medicine during Covid-19 pandemic; creativity and vision in a rapidly changing world"

November 4-6, 2021

VIRTUAL EVENT

Thursday - November 4, 2021	
OPENING OF THE CONFERENCE **9.30 – 9.45** Acad. Maya Simionescu – Director ICBP-NS and President RSCB Acad. Ioan-Aurel Pop – President of the Romanian Academy Prof. Dr. Adrian Curaj – Director of UEFISCDI	
	SESSION 1 **ICBP-NS CONFRONTING THE SARS-CoV-2 PANDEMIC ERA** **Chair: Maya Simionescu** **9.45 - 12.00**
	Maya Simionescu (Director) Uncovering the cell's secrets - a continuous quest of our team **Ileana Manduteanu** (Dept. of Biopathology and Therapy of Inflammation) Mechanisms and novel therapies for aortic valve disease in diabetes **Manuela Calin** (Lab. of Medical and Pharmaceutical Bionanotechnologies) Targeted therapies based on nanocarriers to reduce vascular inflammation **Anca Sima** (Dept. of Lipidomics) In search for new biomarkers for cardiovascular diseases - dysfunctional HDL and epigenetic factors (miRNAs). **Felicia Antohe** (Dept. of Proteomics) Moving forward towards proteomics-based precision medicine in non-communicable diseases **Anca Gafencu** (Lab. of Gene Regulation and Molecular Therapies) Cellular and molecular manipulations for therapeutic purposes **Alexandrina Burlacu** (Lab. of Stem Cell Biology) Harnessing the power of MSC to attenuate the damaging effects of aging, autoimmune diseases and myocardial infarction

	Adrian Manea (Molecular and Cellular Pharmacology - Functional Genomics Laboratory) Epigenetic mechanisms in cardiometabolic disorders: potential biomarkers and therapeutic targets **Irina Titorencu** (Cell and Tissue Engineering Laboratory) Mesenchymal stromal cells: therapeutic potential for skin wound healing
12.00 - 12.30	**Coffee break**
	SESSION 2 **SARS-CoV-2 – INFECTION / INVASIVENESS / VACCINE** **12.30 – 14.00*** **Chair: Maya Simionescu** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
12.30 - 12.50	**Maya Simionescu**, ICBP-NS Dangerous encounters: SARS-CoV-2 - epithelial/ endothelial cell (Intalniri periculoase: SARS-CoV-2 - celula epiteliala/ endoteliala)
12.50 - 13.20	**Victor Voicu**, Vice-President of the Romanian Academy Neuroinvazia virusului SARS-CoV-2, simptomatologie, cai de patrundere si mecanisme patogenice (Neuroinvasion of SARS-CoV-2 virus, symptomatology, penetration routes and pathogenic mechanisms)
13.20 - 13.35	**Gafincu Grigoriu Daniel- Ionut,** "Grigore T. Popa" University of Medicine, Iasi, Romania SARS-CoV-2 UVC inactivation-mechanisms and a new air decontamination equipment
	Fikadu Tafesse, Oregon Health and Science University, USA Vaccine and natural infection elicited COVID-19 immunity against SARS-CoV-2 variants *(This talk will be given at the end of the Session 4)*
13.35 – 14.30	**Lunch and poster session**

	SESSION 3 **NON-COMMUNICABLE DISEASES: ATHEROSCLEROSIS AND DIABETES** **14.30 – 16.25*** **Chairs: Anca Sima, Maria Dorobantu** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
14.30 – 14.55	**Maria Dorobantu,** Floreasca Clinical Emergency Hospital, Bucharest, Romania Genetic aspects in hypertrophic cardiomyopathy: what is new?
14.55 – 15.15	**Camelia Stancu,** ICBP-NS New biomarkers for risk stratification in peripheral artery disease patients – proteins of dysfunctional HDL
15.15 – 15.30	**Viorel Suica,** ICBP-NS Cardiac alarmins as indicators of the efficacy of hypolipidemic treatment in experimental hyperlipidemia
15.30-15.45	**Laura Toma,** ICBP-NS Endothelial dysfunction in diabetes is aggravated by glycated lipoproteins; novel molecular therapies
15.45 – 16.00	**Violeta Trusca,** ICBP-NS Understanding the apolipoprotein E gene regulation, a key step toward the development of novel therapies for atherosclerosis
16.00 – 16.25	**Anca Dobrian,** Eastern Virginia Medical School, USA Learning to listen: understanding extracellular vesicle chatter in obesity co-morbidities
16.25 – 17.00	Coffee break
	SESSION 4 - PhD STUDENTS' PRESENTATIONS **NON-COMMUNICABLE DISEASES: ATHEROSCLEROSIS, DIABETES AND CANCER** **17.00 – 18.10*** **Chairs: Alexandrina Burlacu, Carmen Cotrutz** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
17.00 - 17.10	**Vasile Grecu,** "Grigore T. Popa" Univ. of Medicine, Iasi, Romania The importance of determining and corelating the expression of VEGFR-1, CD4, and CD8 in the evaluation of acute rejection of cardiac allografts – correlative immunohistochemical study

17.10 – 17.20	**Teodora Barbalata**, ICBP-NS MicroRNAs profiling in the heart and liver of high-fat diet induced hyperlipidemic hamster
17.20 - 17.30	**Alexandra Lazar**, ICBP-NS Activation of histone acetyltransferase p300/CBP - dependent signalling pathways induces oxidative stress, inflammation, and fibrosis in the kidney of diabetic mice
17.30 – 17.40	**Evelyn Rusu**, ICBP-NS MiRNAs generated from Meg3-Mirg locus are downregulated during aging
17.40 – 17.50	**Ioana Karla Comarita**, ICBP-NS Therapeutic potential of stem cell- derived extracellular vesicles on atherosclerosis-induced vascular dysfunction
17.50 - 18.00	**Maria Anghelache**, ICBP-NS Preparation and characterization of macrophage-membrane-coated nanoemulsions for delivery of specialized pro-resolving lipid mediators of inflammation
18.00 – 18.10	**Botezatu Ionut Catalin**, "Grigore T. Popa" Univ. of Medicine, Iasi Expression of MT1-MMP and CD147 in gingival tissue of patients with diabetes mellitus-corelative immunohistochemical study

Friday - November 5, 2021	
	SESSION 5 **CELLULAR DYNAMICS IN DISTRESS AND DISEASE** **9.30 – 11.05*** **Chair: Anca Gafencu** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
09.30 - 10.00	**Stefan Constantinescu**, Catholic Univ. of Louvain, Belgium Clonal hematopoietic driver and epigenetic mutations in myeloid cancers: relevance beyond hematology
10.00 - 10.25	**Shlomo Sasson**, The Hebrew University of Jerusalem, Israel Monounsaturated fatty acids protect insulin-secreting beta cells against free fatty acid-induced cytotoxicity

10.25 - 10.50	**Simona Chera,** University of Bergen, Norway Mapping islet cell interconversion phenomena
10.50 - 11.05	**Mirel Adrian Popa,** ICBP-NS The role of FGFR2 signalling in modulating MMP/TIMP balance in cardiac myofibroblasts
11.05 – 11.30	**Coffee break**
	SESSION 6 **THE ANNUAL GENERAL MEETING OF RSCB MEMBERS - REPORTS OF THE PRESIDENTS OF THE SOCIETY BRANCHES** **11.30 – 13.00** **Chair: Maya Simionescu**
	Antoaneta Chesca, President RSCB - Brasov Branch **Carmen- Elena Cotrutz,** President RSCB - Iasi Branch **Anca Hermenean,** President RSCB - Arad Branch **Catalina Pisoschi,** President RSCB - Craiova Branch **Daciana Sava,** President RSCB - Constanta Branch **Anca Ileana Sin,** President RSCB - Targu Mures Branch **Doina Verdes,** President RSCB - Timisoara Branch **TBA,** President RSCB - Cluj Branch **Maria Tolbaru,** Accountant of RSCB
13.00 – 13.40	**Lunch and poster session**
	SESSION 7 **PhD STUDENTS' PRESENTATIONS** **CELLS AND CELLULAR DERIVATIVES IN THERAPY** **13.40 – 15.10*** **Chairs: Felicia Antohe, Anca Hermenean** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
13.40 - 13.50	**Daniela-Madalina Iacomi,** ICBP-NS Generation and characterization of an immortalized human adipose-derived mesenchymal stromal cell line
13.50 - 14.00	**Laura Maria Daian**, ICBP-NS Living under stress - Evaluating changes in β cells homeostasis

14.00 - 14.10	**Aurel Cerveanu –Hogas,** ICBP-NS Use of exosomal protein cargo for the prediction and management of gestational diabetes mellitus
14.10 - 14.20	**Raluca Tutuianu**, ICBP-NS Human mesenchymal stromal cells - derived exosomes promote skin wound healing; mechanisms involved
14.20 – 14.30	**Cristina-Andreea Mihaila,** ICBP-NS Polarized N1 and N2 neutrophils acquire distinct phenotypes and functions
14.30 – 14.40	**Neli Olah,** "Vasile Goldis" Western University of Arad, Romania Morpho-anatomical and phytochemical study of the Corylus L. species (buds)
14.40 - 14.50	**Rebeca Simona Ignat,** University of Bucharest Antifibrotic effects of Corylus avellana gemmotherapic extract reinforced with chrysin/cyclodextrin nanocomplexes on hepatic stellate cells
14.50 - 15.00	**Letitia Ciortan**, ICBP-NS High glucose induced changes in valvular endothelial cells phenotype in a 3D model of aortic valve disease
15.00 – 15.10	**Geanina Voicu,** ICBP-NS VCAM-1 targeted lipopolyplexes carrying Runx2-shRNA mitigate the osteodifferentiation of 3D-cultured human valvular interstitial cells
15.10 – 15.40	**Coffee break**
	SESSION 8 **CARDIOMYOPATHY, INFLAMMATION-RESOLUTION, ATHEROSCLEROSIS** **15.40 – 17.25*** **Chairs: Elena Butoi, Carmen Cotrutz** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
15.40 – 16.05	**Alexandru Schiopu**, Lund University, Sweden The S100A8/A9 alarmin as potential treatment target in inflammatory cardiomyopathies

16.05 – 16.30	**Maria Consiglia Trotta,** "Luigi Vanvitelli" Univ. of Campania, Italy Resolvin D1 actions in ocular pathologies
16.30 – 16.55	**Elena Butoi,** ICBP-NS Polarized neutrophils: versatile players that orchestrate healing or heart failure after myocardial infarction
16.55 - 17.10	**Monica Tucureanu,** ICBP-NS Cellular and molecular mechanisms of complement proteins in human atherosclerotic plaque progression
17.10 - 17.25	**Loredan Nicolescu,** ICBP-NS Epigenetic biomarkers for peripheral artery disease
17.25 - 17.45	**Coffee break**
	SESSION 9 **GENERAL PATHOLOGY - CELLULAR AND MOLECULAR LEVEL** **17.45 – 18.50*** **Chair: Ileana Manduteanu** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
17.45 – 18.10	**Dan Simionescu,** Clemson University, USA Non surgical management of abdominal aortic aneurysms
18.10 – 18.35	**Florea Lupu,** Oklahoma Medical Research Foundation, USA Coagulopathy and endotheliopathy of bacterial and viral infections
18.35 – 18.50	**Doinita Temelie- Olinici,** "Grigore T. Popa" Univ. of Medicine, Iasi Ultrastructural characteristics of keratoachantoma – clinical implications

Saturday - November 6, 2021	
	SESSION 10 **INNOVATIVE THERAPIES, STEM CELLS** **9.30 - 11.05*** **Chair: Manuela Calin** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
9.30 – 9.55	**Manuela Calin,** ICBP-NS P-Selectin directed RAGE-shRNA nanocarriers reduce atherosclerosis-associated inflammation in ApoE-deficient mice
9.55 – 10.20	**Luiza Ghila,** University of Bergen, Norway Modelling pancreatic islet architecture using human induced pluripotent stem cells
10.20 – 10.45	**Ferenc Fenyvesi,** University of Debrecen, Hungary Application of cyclodextrins and calixarenes in the nanoformulations of bioactive compounds
10.45 – 11.05	**Bogdan Preda,** ICBP-NS Local microenvironment activates in vivo apoptosis of mesenchymal stromal cells after transplantation
11.05 – 11.30	**Coffee break**
	SESSION 11 **CELLULAR MODIFICATIONS UNDER STRESS** **11.30 – 13.30*** **Chairs: Gallia Butnaru, Larisa Andronic** * *The speakers are kindly asked to leave time for questions and discussion*
11.30 – 11.55	**Larisa Andronic,** IGPPP Chisinau, Republic of Moldova Cells and biotic stress in plant virus-host systems
11.55 – 12.20	**Mihaela Corneanu**, USAMVB Timisoara, Romania Cyto and genotoxicity of soil and water pollutants

12.20- 12.45	**Tatiana Saltanovici,** IGPPP Chisinau, Republic of Moldova Associated influence of viral pathogens and high temperature on male tomato gametophyte
12.45 – 13.00	**Miruna Stan**, Faculty of Biology Bucharest In vitro research on the anti-cancer potential of some curcumin derivates
13.00 -13.15	**Ana Emanuela Botez,** "Grigore T. Popa" Univ. of Medicine, Iasi β–Defensin and COX-2 expression value in premalignant epithelial lesions: correlative immunohistochemical study
13.15 – 13.30	**Pavel Onofrei,** "Grigore T. Popa" Univ. of Medicine, Iasi Expression value of MMP-14 and EMMPRIN (CD 147) in benign prostatic hyperplasia – comparative immunohistochemical study
13.30 – 14.00	**Lunch and poster session**
	ROUND TABLE **CELLULAR MODIFICATIONS UNDER STRESS** **14.00 - 16.00** **Organiser: Gallia Butnaru**
	Larisa Andronic, IGPPP Chisinau **Mihaela Corneanu,** USAMVB Timisoara **Ioan Sarac,** USAMVB Timisoara **Sorina Popescu,** USAMVB Timisoara **Violeta Turcus,** USAMVB Timisoara **Diana Argherie,** USAMVB Timisoara **Cristina Popescu,** "Vasile Goldis" Western University of Arad **Viviane Bota,** "Vasile Goldis" Western University of Arad
16.00 – 16.30	**CLOSING REMARKS**

Scientific report

Project code: PN-III-P1-1.1-PD-2016-1903/ Contract number: 133PD/2018
Stage nr. 1 / 2018

„Interference with hypoxia-signalling pathways in mesenchymal stem cells prior to transplantation as a strategy to enhance myocardial recovery post infarction"

Summary:

Mesenchymal stem cells (MSC) derived from bone marrow reside *in vivo* in a low oxygen microenvironment (1-5% O_2). However, *in vitro* standard cell culture protocols are performed at atmospheric concentrations of oxygen (21% O_2), which are restrictive growth conditions with selection effects through long-term cultivation by accumulation of loss-of-function mutations that cause cells to escape from the oxygen-induced inhibition growth (Boregowda et al., Stem Cells 2012).

The goal of this project is to better understand the role of hypoxia and more specific of MIR210HG locus on the effector properties of bone marrow-derived human MSC.

The main results obtained at this stage of the project are:

1. Characterization of human bone-marrow derived MSC grown for long-term (three passages) in normoxia (21% oxygen) or hypoxia (5% oxygen). For hypoxia experiments, cells where cultivated within a controlled and sustained workstation environment using the Whitley H35 Hypoxystation. The results showed that low oxygen concentration (5% O_2) slightly increased the proliferation index and cell number, as compared with normoxia (21% O_2).
2. Assessing the metabolic phenotype of MSC as compared to that of another cell type, namely endothelial progenitor cells (EPC) isolated from human umbilical cord blood. This analysis was performed using an Agilent Seahorse XFp system. The results showed that MSC have a more energetic metabolism than EPC, both in basal and stress conditions. Under conditions that mimic hypoxia (with DMOG) both cell types become glycolytic. However, EPC lose any stress response capacity while MSC still have a metabolic activation capacity. Their coculture both under normal conditions and in the presence of DMOG, shows a metabolic response capacity, suggesting that MSC confer an advantage for EPC-based cell therapy when co-transplanted at an ischemic tissue injury.
3. Functional evaluation for the deletion of MIR210HG locus by Real Time PCR for miR-210 and lnc MIR210HG transcripts -001 and -003 expression and by functional metabolic analysis of glycolysis and mitochondrial respiration in control cells and knock-out cells. The results showed that by using CRISPR-Cas9 genome editing technology, the deletion of MIR210HG locus resulted in a decrease in the expression for the MIR210HG ncRNA transcripts with functional impact on the metabolic phenotype of the cells (affecting the mitochondrial respiration).

Date: 04.12.2018

Dr. Mihai Bogdan Preda

Scientific report

Project code: PN-III-P1-1.1-PD-2016-1903/ Contract number: 133PD/2018
Stage nr. 2 / 2019

„Interference with hypoxia-signalling pathways in mesenchymal stem cells prior to transplantation as a strategy to enhance myocardial recovery post infarction"

Summary:

Hypoxia-responsive ncRNAs have yet undefined roles in the biology of mesenchymal stem cells (MSCs). Currently regarded as a "master hypoxamiR" with complex roles in the cellular responses to hypoxia, miR-210 was first discovered by Dr. Mircea Ivan's group (Kulshreshtha et al., Mol Cell Biol 2007) and demonstrated to be induced in response to low oxygen concentrations. As miR-210 improved angiogenesis, inhibited apoptosis, and improved cardiac function in a murine model of myocardial infarction (Hu et al., Circulation 2010), this fundamental regulator of hypoxia might have other yet unknown functions, which extends beyond cell response to hypoxia.

The goal of this project is to improve the pro-angiogenic, anti-inflammatory and immunomodulatory (effector) functions of MSC by manipulating the hypoxia-responsive mechanisms in order to consolidate their therapeutic potential for post-infarction myocardial regeneration.

The main results obtained at this stage of the project are:

1. Our results showed that long-term cultivation (3 weeks) of human MSCs at low O_2 concentrations (3% or hypoxia) have significantly lowered the proliferative capacity of the cells, measured by real-time monitoring of proliferation (xCELLigence), cumulative population doublings, and colony-forming unit fibroblast assay. There are conflicting reports on the effects of low O_2 levels (hypoxia) on MSCs proliferation in vitro. Some studies have shown that MSCs proliferate better when grow at low concentrations of O_2 but others have shown the harmful effect of hypoxia. A possible explanation of this response observed by us would be that the cells were derived and cultured for several passages (3-5) first at the atmospheric concentration of O_2 and thus adapted to this atmospheric microenvironment. Moreover, hypoxia reduced cell proliferation without disturbing the mitochondrial function of MSCs.
2. Adaptation of human MSCs to hypoxia (for 10 days) resulted in increased pro-angiogenic properties (measured by Proteome Profiler Human XL Cytokine Array) and in similar immunomodulatory effect on activated lymphocytes, as normoxic MSC. However, hypoxic MSCs attenuate M1 (pro-inflammatory) activation and enhance M2 (reparatory) activation of THP-1 derived macrophages at a higher level as compared with normoxic MSCs.
3. Gain-of-function and loss-of-function experiments of miR210 expression in human MSC cultivated in normoxic (atmospheric) conditions or short-term exposed to hypoxia (3% O_2) showed that the hypoxia-responsive ncRNA miR210 largely recapitulates the effects of hypoxia. Thus, activation of hypoxia-induced signalling pathways in hMSCs grounds them to increase their pro-angiogenic and anti-inflammatory potential, having a particular importance in MSC-based cell therapy.

Date: 04.12.2019

Dr. Mihai Bogdan Preda

Scientific report

Project code: PN-III-P1-1.1-PD-2016-1903/ Contract number: 133PD/2018
Stage nr. 3 / 2020

„Interference with hypoxia-signalling pathways in mesenchymal stem cells prior to transplantation as a strategy to enhance myocardial recovery post infarction"

Summary:

The OXI-SCENARIO project aimed to improve the effector properties of human mesenchymal stromal cells (MSCs) by *in vitro* targeting of cellular mechanisms of response to hypoxia (low non-physiological oxygen concentration) and to evaluate the therapeutic potential of hypoxia-signalling modulated cells in a preclinical experimental model of mouse with myocardial infarction (MI).

In the last objective we evaluated the role of miR210 locus on the regenerative capacity and migration of MSCs in mice with MI. Our data from gain-of-function and loss-of-function experiments indicated that:

- MiR210 positively modulates MSCs survival after intravenous cell transplantation in mice with myocardial infarction;

- Transplantation of MSCs overexpressing miR210 improved cardiac function by reducing myocardial cell apoptosis in MI border zones and increasing the percentage of immune cell sub-populations involved in the myocardial repair post-infarction (M2 macrophages, and Treg lymphocytes).

Date: 04.11.2020

Dr. Mihai Bogdan Preda

Scientific Report (December 2018 — December 2019)
Project PN-III-P1-1.1-PD-2016-1942

"Evaluation of the therapeutic potential of non-viral apolipoprotein E gene transfer to limit progression of atherosclerosis"

In the frame of the project **PD20/2018 PN-III-P1-1.1-PD-2016-1942** entitled: **„Evaluation of the therapeutic potential of non-viral apolipoprotein E gene transfer to limit progression of atherosclerosis"** in the period December 2018 – December 2019, we performed the experiments planned in the following activity:

A 2.1: Determine the organs transfected by systemic delivery of C60-apoE/GFP polyplexes. Test the time-course evolution of *in vivo* transfection using these polyplexes.

Apolipoprotein E (apoE) has lipid-lowering and anti-atherosclerotic effects, being involved in the clearance of cholesterol-rich lipoproteins and the cholesterol efflux from cells. Our hypothesis is that an increase in apoE expression induced by fullerene-based nanosystems confer anti-atherosclerotic protection. The goal of this proposal is to generate fullerene-based nanoparticles conjugated with DNA encoding full-length or truncated forms of apoE under CMV promoter to be used for *in vivo* non-viral transfection as a therapeutic tool for limiting atherosclerosis progression. The specific objectives are:

1. To generate non-viral transfection agents for expression of apoE3 or its fragments. We accomplished this objective by cloning apoE3 and its N- and C- terminal regions in pcDNA3.1-DYK vector and then the obtained plasmids were linked to C60-PEI conjugates. We confirmed the functionality of C60-PEI-DNA polyplexes as non-viral transfection agents.
2. To assess the timing and organs accumulation of apoE expression after *in vivo* transfection. We accomplished this objective; we determined the organs transfected by systemic delivery of C60-PEI-DNA polyplexes and we tested the time-course evolution of *in vivo* transfection with these polyplexes.

To identify the organs that were efficiently transfected by systemic administration of nanoparticles and to determine the time course of *in vivo* transfection, C57Bl6 mice were injected with C60-PEI polyplexes and DNA encoding: (**A**) apoE3 (pcDNA3.1-DYK-apoE3) or (**B**) luciferase (pGL3-CMV-LUC). (**A**). Two and five days after *in vivo* transfection of mice with C60PEI-apoE polyplexes, human apoE gene expression was detected by RT-PCR. For this, various organs were harvested from the injected mice and homogenized in TRIzol. The RNA isolated was subjected to DNase treatment and reverse-transcribed into cDNA. The mRNA expression of human apoE gene was detected by PCR amplification with specific primers. (B). The signal emitted by luciferase was monitored daily using the XenoLight D-Luciferin substrate and IVIS Spectrum *In Vivo* Imaging System (PerkinElmer). The results showed that the strongest signal for luciferase was detected in liver, lung and spleen two days after systemic administration of C60-PEI-DNA nanoparticles. Thus, by RT-PCR (A) or by using IVIS Spectrum *In Vivo* Imaging System (B), we determined the organs efficiently transfected with C60-PEI-DNA polyplexes and we tested the time-course evolution of *in vivo* transfection using these polyplexes.

In conclusion, the results obtained in this project showed that C60PEI-DNA polyplexes can be successfully used for *in vivo* transfection. The results obtained within the project are part of a manuscript in preparation.

Dissemination

The results obtained this year within the project were presented as posters at the following scientific events:

- "***Fullerene-based nanoparticles conjugated with apolipoprotein E encoding DNA for gene therapy purposes***", Violeta G. **Trusca**, Ioana M. Fenyo, Mădălina Dumitrescu, Mariana Pinteala, Anca V. Gafencu, poster presented at "The 11th National Congress with International Participation and The 37th Annual Scientific Session of the Romanian Society of Cell Biology", Constanta, June, 2019. This poster received „Special Mention - Award".
- "**Optimization** ***of transfection using fullerene-based nanoparticles for gene therapy purposes***", Violeta G. **Trusca**, Ioana M. Fenyo, Mădălina Dumitrescu, Mariana Pinteala, Anca V. Gafencu, poster presented at Annivrsary Simposium of IBPC "N. Simionescu", " A fascinating journey of 40 years to discover the secrets of the cell for the benefit of human health" - Institute of Cellular Biology and Pathology „Nicolae Simionescu", Romanian Academy, Bucharest, 19-20 September 2019.

Publications:

- „***The Opposite Effect of c-Jun Transcription Factor on Apolipoprotein E Gene Regulation in Hepatocytes and Macrophages***". Int J Mol Sci. 2019 Mar 23;20(6). pii: E1471. doi: 10.3390/ijms20061471. **Trusca** VG, Fuior EV, Kardassis D, Simionescu M, Gafencu AV. PMID:30909560. Impact Factor: 4.3.
- „***The mechanism of Bisphenol A atherogenicity involves apolipoprotein AI downregulation through NF-κB activation".*** **Trusca** VG, Dumitrescu M, Fenyo IM, Tudorache FI, Simionescu M, Gafencu AV. This article was sent to publication to International Journal of Molecular Sciences. Impact Factor: 4.3.
- „***Fullerene-based nanoparticles conjugated with apolipoprotein E encoding DNA used as an anti-atherosclerosis therapy***", manuscript in preparation.

Prezentare Proiect CARDIOPRO

Institutul de Biologie si Patologie Celulara “Nicolae Simionescu” (IBPC-NS) este un centru de cercetare fundamentala al Academiei Romane, cu experienta de 33 de ani in studiul la nivel celular si molecular al sistemului cardiovascular in conditii normale si patologice, cu precadere a maladiilor majore care afecteaza grav societatea moderna: ateroscleroza, diabet, obezitate si disfunctiile neurovasculare.

Scopul proiectului:

Extinderea si modernizarea infrastructurii de cercetare in domeniul cardio-diabetologiei in vederea accelerarii rezultatelor stiintifice si a transferului lor din laborator in clinica - medicina translationala.

Aceasta va contribui la cresterea capacitatii de cercetare a echipei IBPC-NS, cu consecinte in profilaxia si imbunatatirea tratamentului bolilor cardiovasculare cat si asupra nivelului de competitivitate a stiintei Românesti si integrarea in Aria Europeana de Cercetare.

Obiectivele proiectului:

1) **Cresterea calitatii si competitivitatii cercetarii** prin achizitionarea de echipamente noi in vederea introducerii tehnologiilor moderne, competitive pe plan European. Dotarea laboratoarelor a fost facuta astfel incat sa sustina noi directii de cercetare in cardio-diabetologie: lipidomica, proteomica, genomica-transcriptomica si terapie moleculara, patofiziologie si farmacologie, biopatologia si terapia inflamatiei si medicina regenerativa.

2) **Promovarea tehnologiilor de virf** in cercetarea orientata pentru prevenirea si tratarea maladiilor cardiovasculare si diabezitate, cercetare menită să contribuie la modernizarea actului medical si prin aceasta la scaderea incidentei grave a mortalitatii prin boli cardiovasculare.

3) **Integrarea IBPC-NS in Aria Europeana de Cercetare** prin intarirea relatiilor de colaborare existente, nationale si internationale.

4) **Valorificarea integrala si extinderea potentialului uman din IBPC-NS**: atragerea de tineri cercetatori, crearea de noi locuri de munca, reducerea „brain-drain”.

5) **Dezvoltarea institutională** bazata pe strategia de dezvoltare existentă a institutului şi elaborarea unui plan de actiuni pe termen scurt, mediu si lung; profesionalizarea managementului cercetării şi consolidării rolului ştiinței în societate.

ROMANIAN ACADEMY
INSTITUTE OF CELLULAR BIOLOGY AND PHATOLOGY
„NICOLAE SIMIONESCU”

THESIS ABSTRACT

The development of targeted anti-inflammatory therapies using nanotransporters of drugs

Scientific coordinator:
Acad. MAYA SIMIONESCU

PhD student:
STAN DANIELA

BUCHAREST
2013

CONTENTS

Foreword 8

Introduction and Objectives..... 9

Part I

Current state of knowledge on the use of nanotransporters to achieve targeted anti-inflammatory therapies

1. Introduction to inflammation..... 11

1.1. Proinflammatory molecules secreted in inflammation..... 12

1.1.1. Cytokines 14

1.1.2. Chemokines 15

1.2. Recruitment and transmigration of leukocytes to the inflammatory site 19

1.2.1. Adhesion molecules involved in leucocytes adhesion and transmigration 20

1.2.2. Transmigration of leucocytes 21

1.3. Resolution of inflammation 23

1.4. Chronic inflammation 26

1.4.1. Causes 27

1.4.2. The role of monocytes/macrophages 28

1.4.3. Fibrosis, characteristic of chronic inflammation 33

2. Using nanotherapy in reducing the inflammatory process 35

2.1. Introduction 35

2.2. Types of nanoparticles transport 37

2.3. The advantages of nanosystems for targeted transport 40

2.4. The use of nanoparticles in the treatment of inflammation 41

2.4.1. Specific targeting of nanoparticles to activated endothelium 41

2.4.1.1. Targeting adhesion molecules: E-selectin, ICAM-1,

VCAM-1, VLA-4 42

2.4.2. Nanoparticle transport to monocytes / macrophages 47

- Monocytes labeled to study the imaging of proinflammatory processes in stroke 47

- Transport of genes with nanoparticles to monocytes / macrophages to reduce inflammation in rheumatoid arthritis 48

- Transport genes with nanoparticles to monocytes / macrophages to reduce inflammation in atherosclerosis 49

- Monocytes / macrophages depletion 50

Part II ORIGINAL CONTRIBUTIONS

Abbreviations 52

I. Targeted transport of nanocarriers with therapeutic agents to activated vascular endothelium 54

I.1. Introduction and objectives 54
I.2. Materials and methods 54

2.1. Preparation of different types of nanoparticles 54
2.1.1. Liposomes preparation 54
2.1.2. Lipid nanoparticles preparation 55
2.1.3. Coupling of ligands on nanoparticle surface 57
2.2. Characterization of nanoparticles 59
2.2.1. Nanoparticle analysis by transmission electron microscopy 59

2.2.2. Determination of nanoparticle size by dynamic light scattering

(DSL) 59

2.2.3. Determination the coupling efficiency of ligands to the liposomes surface 60

2.2.3.1. DTNB method (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) 60
2.2.3.2. HPLC method (High-performance liquid chromatography) . 61

2.3. Determination of VCAM-1 expression on activated endothelial cells 61
2.3.1. ELISA method 62
2.3.2. Flow cytometry method 62
2.4. Study of binding and internalization of liposomes by endothelial cells 63
2.5. Testing capacity liposomes directed to VCAM-1 molecule to specifically bind to ApoE-deficient mice aorta 64
2.6. Tracking the intracellular transport of nanoparticles, carrier of JAK2/STAT3 inhibitor in endothelial cells 66
I.3. Results 69
3.1. Characterization of nanoparticles 69
3.1.1. Transmission electron microscopy 69
3.1.2. Nanoparticles sizing by dynamic light scattering (DSL) 70
3.1.3. Coupling efficiency of ligands to the surface of liposomes 71

3.2. Expression of cell adhesion molecule VCAM-1 on activated endothelial cells . 73
3.3. Liposomes binding on endothelial cells 74
3.4. The ability of liposomes directed to VCAM-1 to specifically bind to ApoE-deficient mice aorta 76
3.5. Intracellular transport of nanoparticle carrier by JAK2/STAT3 inhibitor in endothelial cells 79

II. Developing a nanosistem for specific transport of therapeutic agents to activated endothelial cells to inhibit chemokine-receptor interaction 80

II.1. Introduction and objectives 80
II.2. Materials and methods 82
2.1 Experimental model for the study of monocyte transmigration through the endothelial monolayer 82

2.2. Preparation of target-sensitive liposomes directed to VCAM-1 84
2.3. Characterization of target-sensitive liposomes 85
2.4. Evaluation of target-sensitive liposomes stability 86
2.5. Determination of target-sensitive liposomes binding on endothelial cells 87
2.6. Assessment of marker released encapsulated in target-sensitive liposomes after binding to endothelial cells 88
2.7. Testing the capacity of target-sensitive liposomes binding on ApoE-deficient mice aorta 88
II.3. Results 90
3.1. Effect of inhibition of chemokine/ receptors interaction on monocyte transmigration through the endothelial monolayer 90
3.2. Characterization of target-sensitive liposomes 95
3.2.1. Transmission electron microscopy 95
3.2.2. Size and zeta potential 95
3.3. Target-sensitive liposomes stability..... 97
3.3.1. Influence of temperature and storage time on the stability of target-sensitive liposomes 97
3.3.2. Influence of serum on the stability of target-sensitive liposomes 98
3.4. Target-sensitive liposomes binding to endothelial cells 100
3.5. Release of marker incorporated into target-sensitive liposomes after binding to endothelial cells 101
3.6. Specific binding of target-sensitive liposomes to ApoE-deficient mice aorta .. 103

III. Using nanotechnology to modulate the functions of monocytes / macrophages in order to reduce atherosclerotic plaque inflammation

III.1. Introduction and objectives 104
III.2. Materials and methods 105
2.1. Determination of proinflammatory cytokine production, resistin, by monocytes exposed to high glucose 105
2.1.1. Determination of resistin gene expression by RT-PCR 108
2.1.2. Determination of resistin protein expression by Western blot assay 109
2.1.3. Detection of NF-kB in nuclear fraction of U937 monocytic cells 109

2.2. Determination of interaction between clodronate liposomes and different cell types (monocytes / macrophages, vascular wall cells) 110
2.2.1. Clodronate liposomes preparation 111
2.2.2. Determination of multilamellar and unilamellar liposomes internalization by various cell types 112
2.2.3. Evaluating the effect of incubation with different concentrations of clodronate liposomes on the viability of various cell types 113
2.2.4. Investigation of apoptosis induced by clodronate liposomes in various cell types 114
2.3. Induction of apoptosis in monocytes / macrophages with clodronate liposomes and monitoring the effects of their interaction with the blood wall cells 115
2.3.1. Determination of apoptotic monocyte adhesion to the blood vessel wall cells 116
2.3.2. Evaluating the interaction between apoptotic monocytes and smooth muscle cells on signaling pathways in smooth muscle cells 116
III.3. Results 117
3.1. High glucose up-regulates resistin mRNA expression and protein production in human U937 monocytic cells 117
3.2. Insulin reduces the protein production and mRNA expression of resistin in high glucose exposed monocytic cells 120
3.3. Interaction between clodronate liposomes and various cell types (monocytes / macrophages, vascular wall cells) 127
3.3.1.Clodronate liposomes internalization by various cell types 127
3.3.2. Effect of incubation with different concentrations of clodronate liposomes on the viability of various cell types 129
3.3.3. Apoptosis induced by clodronate liposomes in various cell types 131
3.4. Induction of apoptosis in monocytes / macrophages with clodronate liposomes and monitoring the effects of their interaction with the wall blood cells 133
3.4.1. Clodronate liposomes increases caspase 3 activity in monocytes 133
3.4.2. Apoptotic monocytes Show an increased adhesion to blood vessel wall cells 134

3.4.3. Interacting between apoptotic monocytes and smooth muscle cells modulate phosphorylation of ERK and p38 proteins 135
3.4.4. Interaction between apoptotic monocytes and smooth muscle cells decrease their proliferation 136
Results and conclusions 141
Bibliography 143
List of published papers..... 155
Papers published in national journals CNCSIS 156
List of papers presented at scientific meetings 156
Paper presented at international events appeared in ISI journals (Proceedings) 156
Posters at international scientific events 157
Posters at national scientific events 164

Keywords: inflammation, acute inflammation, chronic inflammation, cytokines, chemokines, endothelial cells, human vascular smooth muscle cells, monocytes / macrophages, cell adhesion molecules, apoE-deficient mice, adhesion, transmigration, nanotherapy, nanocarriers, lipid nanoparticles, liposomes , chemokine receptor antagonists, resistin, MAPKinases, clodronate, apoptosis.

Inflammation is a mechanism of the innate immune system as part of a complex biological response of vascular tissue to harmful stimuli (pathogens, damaged cells, irritants). The end result of the inflammatory process is to protect the body by infection and to restore the structure and function of damaged tissues. Inflammation may be un acute reaction, resulting in the elimination of inflammatory stimuli and tissue recovery in physiological conditions, or may be chronic reaction leading to exacerbation and the developing of various pathologies, depending on the reaction severity. Chronic inflammation is involved in numerous pathologies including atherosclerosis, cancer, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, inflammatory bowel disease, Alzheimer's, lupus, allergies, etc..

Activated endothelium has an important role in the inflammatory. Under normal conditions, the vascular endothelium is non-thrombogenic and non-sticky. Changes in the microenvironment affects endothelial cells that will express adhesion molecules (VCAM-1, ICAM-1, E-and P-selectin, fractalkina), which determine leucocytes and platelets recruitement and adhesion by their corresponding receptors. In addition to adhesion molecules, chemokines such as MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5), fractalkina (CX3CL1) express by endothelial cells bind to receptors on the surface of leukocytes and with adhesion molecules contribute to their adhesion and transmigration. Chemokines bind to glycosaminoglycans present on the endothelial cell membrane and guide the entry of leukocytes into arterial wall. Monocytes are attracted by CCL2, CCL5 and CX3CL1 that activate their receptors CCR2, CCR5 and CX3CR1 on monocytes.

Due to the involvement of cellular adhesion molecules and chemokines in the development of chronic inflammatory diseases, therapeutic intervention lead to new opportunities in prevention and treatment of these diseases. Functional manipulation of chemokine system, such as inhibition of chemokine / chemokine receptors interaction using chemokine antagonists (CA) or chemokine receptor antagonists (CRA), could be an important therapeutic option to prevent the inflammatory cells accumulation and diseases progress (atherogenesis, metastasis). An approach to modulate drug targeting to a specific site is to design transport vehicles able to "deliver" the drug in the cell and to recognize targeted

molecules. The most promising for targeting to specific sites of nanotransporters is the attachment of ligands on their surface able to carry the active substance in the cell or to recognize specific target molecules.

This thesis has proposed the introduction of different therapeutic strategies based on nanoparticles to control inflammation and to interfere in the steps of recruitment leukocytes due to the association between chronic inflammation and various diseases and the impoatant role of leukocyte adhesion and subendothelial migration . The first part will present current issues on the use of nanoparticles for the development of targeted anti-inflammatory therapies. The original part of the paper is focused on (1) the development of therapeutic agents nanocarriers to achieve a targeted transport to activated vascular endothelium, the purpose beeing to interfere selectively with endothelial dysfunction or inhibit chemokine-receptor interaction and to prevent accumulation of pro-inflammatory cells in the vessel wall, and (2) the use of nanoparticles to modulate the monocytes / macrophages functions in order to reduce atherosclerotic plaque inflammation.

The first part of the thesis shows the current state of knowledge and is organized in two chapters.

Chapter 1 presents general concepts about inflammatory process. Penetration of pathogenic microorganisms or shel altered molecules, lead to onset of an acute inflammatory response characterized by infiltration of neutrophils in the first 6-24 hours and then are replaced by monocytes / macrophages. Proinflammatory agent is removed and reversible collateral tissue injury occurs, cellular debris removal by macrophages and restoration of tissue homeostasis with complete restoration of the original tissue architecture. If it is not properly induced an inflammatory response, the stimulus persists, there is infiltration of macrophages and lymphocytes that synthesize cytokines and chemokines and amplify the inflammatory response, causing irreversible tissue damage. It produces fibrosis - initial tissue is replaced by connective tissue. Chronic inflammation is involved in numerous pathologies such as atherosclerosis, chronic obstructive pulmonary disease, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, cancer, obesity, asthma, inflammatory bowel disease, and neurodegenerative diseases.

Chapter 2 presents some introductory concepts about nanotherapy in decreasing the inflammatory process. Many cells and mediators involved in inflammation, can be used as markers in the target or in the disease stage detection .

Patients presentation in late stages of the disease, the organisms failure to adapt at current therapy models, and improving the biological activity of pharmacological agents / drugs by encapsulation in nanoparticles led to the development of a new therapy and diagnostic strategies - nanoteragnostic that it assume both patient diagnosis and treatment.

Because unincorporated drugs can easily diffuse from /in blood vessel, leading to a decrease of the active substance in the affected area, was performed their encapsulation in the nanoparticles. If nanoparticles have left the blood vessel, they can not coming back because of their large size and has place a progressive accumulation in the affected area. coupling of peptides or antibodies to the nanocarriers surface, able to recognize molecules expressed by affected cells may lead to a targeted transport of active substances in the affected tissue.

In Part II - "Original Contributions" are presented the results of experiments aimed at controlling inflammation and able to interfere in the steps of leukocyte recruitment. The present work was centralized to achieve three major objectives:

I. targeted transport in activated vascular endothelium using nanocarriers for therapeutic agents to selectively interfere with endothelial dysfunction

II. development of a specific transport nanosistem compounds to activated endothelial cells to inhibit chemokine-receptor interaction, in order to prevent accumulation of proinflammatory cells in the vascular wall

III. using nanotechnology to modulate functions of monocytes / macrophages to reduce atherosclerotic plaque inflammation.

In Chapter I I presented targeted transport of therapeutic agents in nanocarriers to activated vascular endothelium. In inflammation, the endothelium plays an important role. Excessive and sustained exposure to pro-inflammatory mediators lead to endothelial dysfunction translated, in part, by expressing of cell surface adhesion molecules (eg E-and P-selectin, VCAM-1 and ICAM-1) that mediate leukocyte recruitment and adhesion to endothelium.

Induction or increased expression of specific molecules provides opportunities for the transport of selective therapeutic agents to an certain affected endothelial vascular segment.

To achieve a selective transport to activated endothelium they were used various nanosystems (liposomes, lipid nanoparticles) and was evaluated the targeting ability of nanocarriers to activated endothelium compared with normal endothelium, internalization efficiency of nanoparticles by endothelial cells, and therapeutic effects of compound incorporated into nanoparticles.

In this purpose, were performed studies in vitro, on cultured endothelial cells and also was followed targeted efficiency of vascular endothelium with liposomes using animal models using transgenic mice that develop atherosclerosis (ApoE-deficient mice). In vitro and in vivo results indicate a specific binding of liposomes directed to VCAM-1 and the liposomes obtained can be further used as carriers of drugs to endothelium covering atheromatous plaques.

Also, preliminary results show that AG490,free and encapsulated in nanoparticles contribute to decreasing of monocytes adhesion to activated endothelium by inhibiting Jak2/STAT3 pathway, and the effect of the inhibitor is increased by encapsulation in nanocarriers.

Chapter II is focused to obtein a specific transport nanosistem of therapeutic agents, able to destabilize and controlled release of compound encapsulated on the target cell surface. These nanocarriers could be efficient means of trasnsport that allow a controlled release of the chemokine receptor antagonists on the surface of the activated endothelial cells that block the chemokine / chemokine receptors interaction and prevent the transmigration of leukocytes into the subendothelial space.

Leukocyte infiltration is strongly regulated by chemokines. Chemokines are small polypeptides, highly specialized, which function as regulators of cell trafficking through interactions with G protein-coupled receptors on the surface of leukocytes. In our research we studied the effect of chemokine receptor antagonists on monocytes adhesion and infiltration through endothelial monolayer mimicking inflammatory conditions. Using Xcelligence system, I followed in real time: 1) endothelial cells monolayer formation, 2) the effect of proinflammatory cytokine TNF-α on endothelial cells, 3) adhesion and infiltration of monocytes and 4) the protective effect of chemokine receptor antagonists on the monolayer integrity. The data indicate that blocking the chemokine receptor CCR2 and CCR5 can significantly reduce transmigration through the endothelium, this being achieved through a decrease in the accumulation of monocytes in the blood vessel wall and reduce the inflammatory process. However, experimental and clinical testing of potential inhibitors of chemokines and their receptors for the treatment of inflammatory and immunological diseases have side effects. Local transport of chemokine receptors antagonists, in certain areas may be a better strategy to slow down or interrupt the inflammatory process. Design of transport vehicles to be able to "deliver" the drug at the affected site is a promising way to treat inflammation. Therefore, to obtain a therapeutic benefit by specific targeting of activated endothelial, we designed target-sensitive liposomes capable to release the compund

incapsulated-in after binding to target. They can be efficient transport vehicles for a controlled release of the chemokine receptor antagonists to activated endothelial surface capable to block chemokine / chemokine receptors interaction and to prevent transmigration of leukocytes into the subendothelial space.

In Chapter III I watched the modulation functions of monocytes / macrophages using nanotechnology in order to reduce atherosclerotic plaque inflammation.

Macrophages are essential in the inflammatory process that accompanies atherogenesis, from fatty streaks formation until to the processes leading to plaque rupture and acute coronary syndromes. One of the objectives was to follow the production of a recently discovered proinflammatory cytokine, resistin, by human monocytes as a result of their exposure to high glucose. We also investigated the mechanisms involved in the administration effect of clodronate liposomes (treatment leads to depletion of monocytes / macrophages) on the viability of vascular wall cells (endothelial cells - EC, smooth muscle cells - SMC), monocytes and macrophages. We studied the effects of apoptotic monocyte interaction with vascular wall cells and we looked at monocytes / macrophages adhesion to endothelial cells, smooth muscle cells and changes occurring in proliferation (PCNA) and intracellular signaling pathways (MAPKinazele: p38 and ERK) in smooth muscle cells.

The results show that: (1) significant levels of glucose induce resistin expression in human monocytic U937 (mRNA and protein), (2) p38, ERK1 / 2 and JNK MAPKinases and NF-kB transcription factor are involved in this mechanism, (3) insulin significantly reduced resistin expression induced by high glucose independent of signaling pathways MAPKinases: PI3K, ERK1 / 2 and p38.

Experiments designed to study the administration effects of clodronate liposomes on vascular wall cells and monocytes / macrophages show that small unilamellar liposomes are taken predilection by endothelial cells and smooth muscle cells, whereas multilamellar liposomes are internalized by human monocytes U937, murine macrophages Raw 264.7 and peritoneal macrophages isolated from mice. cell viability studies have shown that endothelial cells and smooth muscle cells viability is not significantly affected by MLV and SUV encapsulated clodronate, whereas, the biological activity of clodronate encapsulated in MLV on macrophages is higher than free clodronate with a significant decrease in their viability; the type of cell death induced is apoptosis.

Induction of apoptosis in monocytes determine changes in their interactions with vascular wall cells. Communication between apoptotic cells and smooth muscle cells causes a decrease in proliferation 35% and phosphorylation of p38 (~ 35%) and ERK (70%)

MAPkinases in smooth muscle cells. Also, the monocyte apoptosis was induced by clodronate liposomes show increased adhesion to blood wall cells compared with normal monocytes. Following the results obtained in different experimental models with inflammation and by using different types of nanotransport, we can draw the following conclusions: 1) liposomes directed to VCAM-1 are able to transport drugs to activated endothelial cells , 2) lipid nanoparticles can be used for intracellular transport in the endothelial cells of hydrophobic substances, 3) the nanosystem of target-sensitive transport developed can provide local therapeutic agents in the vicinity of activated endothelium and 4) the liposomes may be able to transport active substances to modulate the functions of monocytes / macrophages for reducing the inflammatory process.

Studies in this paper are the applicative nature, the ultimate goal being to control and reduce the inflammatory process using different therapeutic strategies based on nanocarriers.

Number of figures in the first part - 17

Number of figures in the original (Part II) - 40

Indications bibliography – 177

Papers published in international journals ISI - 10

Papers published in national journals CNCSIS – 2

Abstracts of posters presented at international scientific meetings - 48

Abstracts of posters presented at national scientific meetings - 6

Trainings and courses – 4

Participation in research projects - 4 national, 2 international.

L'ACADÉMIE ROUMAINE

INSTITUT DE BIOLOGIE ET PATHOLOGIE CELLULAIRE

„NICOLAE SIMIONESCU”

Le développement de thérapies anti-inflammatoires ciblées utilisant nanotransporters des médicaments

RÉSUMÉ

Scientifique:

Acad. MAYA SIMIONESCU

PhD:

STAN DANIELA

BUCAREST

TABLE DES MATIÈRES

Avant-propos 1

Présentation 5

PARTIE I

État actuel des connaissances sur l'utilisation des nanotransporteurs pour effectuer des traitements anti-inflammatoires ciblées

1. Introduction à l'inflammation 11

1.1. Molécules pro-inflammatoires sécrétées dans l'inflammation 12

1.1.1. Cytokines 14

1.1.2. Chimiokine 15

1.2. Le recrutement et la transmigration des leucocytes au site inflammatoire 19

1.2.1. Les molécules d'adhésion impliquées dans l'adhérence et la transmigration des leucocytes 20

1.2.2. La transmigration des leucocytes 21

1.3. Résiliation du processus inflammatoire 23

1.4. L'inflammation chronique 26

1.4.1. Causes 27

1.4.2. Le rôle des monocytes / macrophages 28

1.4.3. Fibrose, caractéristique de l'inflammation chronique 33

2. Utilisation de la nanothérapie pour réduire les processus inflammatoires 35

2.1. Introduction 35

2.2. Types de transport de nanoparticules 37

2.3. Les avantages de nanosystèmes pour le transport ciblé 40

2.4. L'utilisation des nanoparticules dans le traitement de l'inflammation 41

2.4.1. Ciblage spécifique des nanoparticules à l'endothélium activé 41

2.4.1.1. Le ciblage des molécules d'adhésion: E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1, VLA-4 42

2.4.2. Le transport des nanoparticules par les monocytes / macrophages 47

- Monocytes marquage pour étudier par imagerie les processus pro-inflammatoires dans accident vasculaire cérébral 47

- Transport du gènes utilisant des nanoparticules à monocytes / macrophages pour réduire l'inflammation dans la polyarthrite rhumatoïde 48

- Transport du gènes utilisant des nanoparticules à monocytes / macrophages pour réduire l'inflammation dans l'athérosclérose 49

- Suppression de monocytes / macrophages ….. 50

PARTIE II CONTRIBUTIONS ORIGINALES

Abréviations 52

I. Transport ciblé de nanotransporteursavec agents thérapeutiques à l'endothélium vasculaire activé 54

I.1. Introduction et objectifs 54
I.2. Matériels et méthodes 54

2.1. Préparation des différents types de nanoparticules 54
2.1.1. Préparation de liposomes 54
2.1.2. Préparation de nanoparticules lipidiques 55
2.1.3. Le couplage de ligands à la surface de la nanoparticule 57
2.2. Caractérisation des nanoparticules 59
2.2.1. Analyse des nanoparticules par microscopie électronique à transmission 59

2.2.2. Détermination de la taille des nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière laser (DSL) 59

2.2.3. Détermination de l'efficacité de couplage de ligands en surface des liposomes 60

2.2.3.1. DTNB technique (5-5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque)) .. 60
2.2.3.2. HPLC technique (Chromatographie Liquide Haute Performance) 61

2.3. Détermination de l'expression de la molécule d'adhésion cellulaire de VCAM-1 sur les cellules endothéliales activées 61
2.3.1. ELISA technique 62
2.3.2. La cytométrie en flux technique 62
2.4. Etude de la liaison et l'internalisation des liposomes par les cellules endothéliales 63
2.5. Test de capacité des liposomes directionees a VCAM-1 de se lier spécifiquement à aorte des souris ApoE-déficientes 64
2.6. Le suivi du transport intracellulaire de nanoparticules avec inhibiteur de JAK2/STAT3 dans les cellules endothéliales 66

I.3. Résultats 69
3.1. Caractérisation des nanoparticules 69
3.1.1. Microscopie électronique à transmission 69
3.1.2. La taille des nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière laser (DSL) 70
3.1.3. Le rendement de couplage de ligands sur la surface de liposomes 71

3.2. L'expression de la molécule d'adhésion cellulaire VCAM-1 sur les cellules endothéliales activées 73
3.3. Liaison des liposomes aux cellules endothéliales 74
3.4. Capacité des liposomes directionees a VCAM-1 de se lier spécifiquement à aorte des souris ApoE-déficientes 76
3.5. Transport intracellulaire de nanoparticules support pour inhibiteur de JAK2/STAT3 dans les cellules endothéliales 79

II. Développment d'un nanosystème de transport des agents thérapeutiques spécifiques aux surface des cellules endothéliales activées pour inhiber l'interaction chimiokine-récepteur 80

II.1. Introduction et objectifs 80
II.2. Matériels et méthodes 82
2.1 Modèle expérimental pour l'étude de la transmigration des monocytes à travers monocouche de cellules endothéliales 82
2.2. Préparation de liposomes cibles sensibles destinées à VCAM-1 84
2.3. Caractérisation des liposomes cibles sensibles 85
2.4. Évaluation de la stabilité des liposomes cibles sensibles 86
2.5. Détermination de la liaison de liposomes cible sensibles à la surface des cellules endothéliales 87
2.6. Estimation de libération de marquer intégré dans liposomes cibles sensibles après liaison aux cellules endothéliales 88
2.7. Essais la capacité liposomes cibles sensibles pour lier spécifique de l'aorte des souris ApoE- déficientes 88

II.3. Résultats 90
3.1. Effet de l'inhibition de l'interaction des chimiokines / récepteurs sur la transmigration des monocytes à travers la monocouche endothéliale 90
3.2. Caractérisation des liposomes cibles sensibles 95
3.2.1. Microscopie électronique à transmission 95
3.2.2. Taille et le potentiel Zeta 95
3.3. Stabilité des liposomes cible sensibles 97
3.3.1. Influence de la température et du temps de stockage sur la stabilité des liposomes cible sensibles 97
3.3.2. Influence du sérum sur la stabilité des liposomes cible sensibles 98
3.4. Liaison des liposomes cible sensibles sur la surface la surface des cellules endothéliales 100
3.5. Libération du marqueur incorporé dans les liposomes cible sensible après la liaison a surface des cellules endothéliales 101
3.6. Liaison spécifique de liposomes cibles sensibles a l'aorte des souris ApoE-déficientes 103

III. Utilisation de la nanotechnologie pour moduler les fonctions des monocytes / macrophages afin de réduire l'inflammation de la plaque athéroscléreuse 104

III.1. Introduction et objectifs 104
III.2. Matériels et méthodes 105
2.1. Détermination de la production de cytokine pro-inflammatoire résistine par les monocytes exposés à concentrations élevés de glucose 105
2.1.1. Détermination de l'expression du gène resistin par RT-PCR 108
2.1.2. Détermination de l'expression du protéine résistine par Western blot 109
2.1.3. Détection du facteur de transcription NF-kB dans la fraction nucléaire isolé à partir de monocytes 109
2.2. Détermination de l'interaction entre liposomes au clodronate et les différents types de cellules (monocytes / macrophages, les cellules du paroi vasculaire) 110
2.2.1. Obtenir des liposomes clodronate 111
2.2.2. Détermination de l' internalisation de liposomes multilamellaires et unilamellaires par divers types de cellules 112
2.2.3. L'évaluation de l'effet de l'incubation avec différentes concentrations de liposomes de clodronate sur la viabilité des différents types cellulaires 113
2.2.4. Investigation de l'apoptose induit des liposomes de clodronate dans différents types cellulaires..... 114
2.3. L'induction de l'apoptose dans les monocytes / macrophages avec des liposomes de clodronate et suivir les effets de leur interaction avec les cellules paroi vasculaire ……..... 115
2.3.1. Détermination de l'adhérence des monocytes apoptotiques sur les cellules du paroi vasculaire 116
2.3.2. . L'évaluation de l'interaction entre les monocytes apoptotiques et les cellules musculaires lisses sur des voies de signalisation dans les cellules de muscle lisse 116

III.3. Résultats .....,,,,..... 117
3.1. Concentrations élevés de glucose induit l'expression du gène et de la protéine résistine dans les monocytes 117

3.2 L'insuline diminue l'expression du gène et de la protéine résistine dans les monocytes exposés à concentrations élevés de glucose 120
3.3. L'interaction entre les liposomes de clodronate et divers types de cellules (monocytes / macrophages, les cellules du paroi vasculaire) 127
3.3.1 Internalisation des liposomes au clodronate par des diverse types de cellules 127
3.3.2. Effet de l'incubation avec différentes concentrations de liposomes au clodronate sur la viabilité des différents types cellulaires 129
3.3.3. Apoptose induits par les liposomes au clodronate dans différents types cellulaires 131
3.4. L'induction de l'apoptose dans les monocytes / macrophages avec des liposomes de clodronate et surveiller les effets de leur interaction avec les cellules du paroi vasculaire 133
3.4.1. Liposomes au clodronate augmente l'activité de caspase 3 dans les monocytes 133
3.4.2. Les monocytes apoptotique augmenté une adhérence accrue aux cellules de la paroi des vaisseaux sanguins 134
3.4.3. L'interaction des monocytes apoptotiques et des cellules musculaires lisses modulent phosphorylation des protéines ERK et p38 135
3.4.4. L'interaction entre les monocytes apoptotiques et des cellules musculaires lisses entraîne la prolifération diminué 136
Résultats et conclusions..... 141
Bibliographie 143
Liste des articles publiés 155
Articles publiés dans des revues CNCSIS national 156
Liste des documents présentés lors scientifique 156
Document présenté lors d'événements internationaux qui se produisent dans des revues ISI (Actes) 156
Posté le scientifique internationale 157
Posté le scientifique national 164
Subventions 165

Mots-clés: inflammation, inflammation aiguë, inflammation chronique, cytokines, chimiokines, des cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires humaines, monocytes / macrophages, des molécules d'adhérence cellulaire, souris déficientes en ApoE, adhérence, transmigration, nanothérapie, nanotransporteurs, nanoparticules lipidiques, liposomes, antagonistes des récepteurs de chimiokines, résistine, MAP kinases, clodronate, apoptose.

L'inflammation est un mécanisme du système immunitaire inné dans le cadre d'une réponse biologique complexe de tissus vasculaires aux stimuli nuisibles (pathogènes, les cellules endommagées, des irritants). Le résultat final du processus inflammatoire est de protéger l'organisme contre l'infection et la restauration structurelle et fonctionnelle des tissus endommagés. Selon la gravité de la réaction peut être une inflammation aiguë, entraînant l'élimination des stimuli inflammatoires et la récupération des tissus dans les conditions physiologiques, ou peut être un processus inflammatoire chronique conduisant à l'exagération et l'apparition de diverses pathologies. L'inflammation chronique est impliquée dans de nombreuses pathologies, notamment l'athérosclérose, le cancer, l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, la maladie intestinale inflammatoire, la maladie d'Alzheimer, le lupus, les allergies, etc.

Un rôle important dans le processus inflammatoire revient a l'activation de l'endothélium. Dans des conditions normales, l'endothélium vasculaire est non thrombogène et non adhérente. Les changements dans micro-environnement affecte les cellules endothéliales qui expriment molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1, E et la sélectine P, fractalkine), qui en se liant aux récepteurs correspondants sur la surface des leucocytes et des plaquettes, conduisent à leur recrutement et leur adhésion à l'endothélium. En plus de molécules d'adhésion, les cellules endothéliales expriment de chimiokines telles que la MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5), fractalkine (CX3CL1) qui se lient à des récepteurs homologues sur la surface des leucocytes et ensemble aux les molécules d'adhérence contribuent à leur adhérence et au transmigration. Les chimiokines se lient aux glycosaminoglycanes présents sur la membrane des cellules endothéliales et guident l'entrée des leucocytes dans la paroi artérielle. Les monocytes sont attirés par des chimiokines CCL2, CCL5 et CX3CL1 qui activent les récepteurs CCR2, CCR5 et CX3CR1 sur les monocytes.

En raison de l'implication des molécules d'adhésion cellulaire et des chimiokines dans le développement des maladies inflammatoires chroniques , l'intervention thérapeutique ouvre de nouvelles perspectives dans la prévention et le traitement de ces maladies.

Manipulation functionelle du système des chimiokines , comme inhiber de l'interaction chimiokines / récepteurs des chimiokines, en utilisant des antagonistes des chimiokines (AC) ou des antagonistes des récepteurs de chimiokines (ARC) pourrait être une option thérapeutique importante pour éviter l'accumulation de cellules inflammatoires et l'aggravation de la maladie (athérogenèse, métastases). Une approche de moduler le ciblage d'un médicament à un site spécifique est de concevoir des véhicules de transport pour être en mesure de «livrer» le médicament au site actif affecté. Le façon plus prometteur pour cibler des nanotransporteurs aux sites spécifiques est la fixation du ligands sur leur surface qui peut transporter la substance active dans la cellule ou de reconnaître des molécules cibles spécifiques.

Compte tenu de l'association de l'inflammation chronique à diverses maladies et le rôle joué de l'adhérence des leucocytes à l'endothélium et la migration endothéliale, cette thèse a proposé l'introduction de différentes stratégies thérapeutiques en fonction des nanoparticules pour contrôler l'inflammation et de s'ingérer dans les étapes de recrutement globules blancs. La première partie présente les enjeux actuels sur l'utilisation de nanoparticules pour le développement de thérapies anti-inflammatoires ciblées. La partie originale de l'article se concentre sur (1) le développement de transporteurs d'agents thérapeutiques par parvenir un transport cible a l'endothélium activé afin d'interférer sélectivement avec dysfonction endothéliale ou inhiber l'interaction chimiokine-récepteur afin d'éviter l'accumulation de cellules pro-inflammatoires dans paroi vasculaire et (2) l'utilisation des nanoparticules pour moduler les fonctions des monocytes / macrophages afin de réduire l'inflammation de la plaque athéroscléreuse.

La première partie de la thèse montre l'état actuel des connaissances et est organisé en deux sections.

La première section présente les notions générales sur le processus inflammatoire. La pénétration des micro-organismes pathogènes ou des molécules propres modifiées , provoque le déclenchement d'une réponse inflammatoire aiguë caractérisée par une infiltration de neutrophiles dans les premiers 6-24 heures, et apres leur remplacément par des monocytes / macrophages. Survient l'elimonation de l'agent pro-inflammatoire avec lésion réversible de le tissus de collatéral, enlèvement des debris cellulaire par les macrophages et la restauration de l'homéostasie avec restauration complète de l'architecture initiale du tissu. Si une réponse inflammatoire n'est pas correctement induit, le stimulus persiste, il y a infiltration des macrophages et des lymphocytes qui synthétisent des cytokines et de chimiokines qui amplifient la réponse inflammatoire, provoquant des lésions irréversibles des tissus. Elle

produit une fibrose - tissu initial est remplacé de tissus conjonctif. L'inflammation chronique est impliquée dans de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose, la bronchopneumopathie chronique obstructive, la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, le cancer, l'obésité, l'asthme, les maladie intestinale inflammatoire, et les maladies neurodégénératives.

La section 2 présente quelques concepts préliminaires sur l'utilisation nanothérapie à réduire le processus inflammatoire. De nombreuses cellules et les médiateurs de l'inflammation, peuvent être utilisés comme marqueurs de la cible ou à l'étape de détection de la maladie.

Présentation des patients à un stade avancé de la maladie, l'incapacité des organismes à répondre à des modèles de thérapie en cours, et l'amélioration de l'encapsulation de l'activité biologique d'agents pharmacologiques / médicaments dans des nanoparticules a conduit au développement d'une nouvelle thérapie et les stratégies de diagnostic - nanoteragnostic qui supposent au meme temps le diagnostic et le traitement du patient.

Parce que les médicaments peuvent facilement diffuser à l'extérieur ou en le vaisseau sanguin, conduisant à une diminution de la substance active dans la zone touchée a été adoptée à l'encapsulation des nanoparticules que une fois qu'ils ont quitté le vaisseau sanguin ne reviendront pas en raison de leur grande taille conduisant à leurs accumulation progressive dans la zone touchée. Ajoutant de peptides des nanotransporteurs ou de anticorps sur la surface, capable de reconnaître des molécules exprimées par les cellules affectées peut conduire à un transport dirigé de substances actives dans les tissus touchés.

Dans la Partie II - "contributions originales" sont présentés les résultats d'expériences visant à contrôler l'inflammation et capable d'intervenir dans les étapes de recrutement des leucocytes. Le présent travail était centralisé à atteindre trois grands objectifs:

I. le transport ciblé dans endothélium vasculaire activé utilisant nanotransporteurs d' agents thérapeutiques pour interférer sélectivement avec dysfonction endothéliale,

II. le développement d'un nanosistem de transport spécifiques des composés aux cellules endothéliales activées pour inhiber l'interaction chimiokine-récepteur, afin d'éviter l'accumulation de cellules pro-inflammatoires dans la paroi vasculaire

III. utiliser la nanotechnologie de moduler les fonctions des monocytes / macrophages pour réduire l'inflammation de la plaque d'athérome.

Dans le chapitre I, nous avons présenté le transport ciblé de nanotransporteurs d'agents thérapeutiques à l'endothélium vasculaire activé. Dans l'inflammation, l'endothélium joue un rôle important. Une exposition excessive et prolongée à des médiateurs pro-

inflammatoires conduisent à la dysfonction endothéliale qui se traduit, en partie, par l'expression des molécules d'adhésion à la surface cellulaire (par exemple, E et P-sélectine, VCAM-1 et ICAM-1) qui interviennent dans le recrutement et l'adhésion des leucocytes à l'endothélium. Induction ou augmentation de l'expression de molécules spécifiques offre des possibilités pour le transport sélective d'agents thérapeutiques à l'endothélium affectée d'un segment vasculaire. Pour obtenir un transport sélectif à l'endothélium activé ont été utilisés différents nanosystèmes de transporter (liposomes, nanoparticules lipidiques) et d'évaluer le capacité de ciblage du nanotransporteurs à l'endothélium activé par rapport à l'endothélium normal, l'efficace de l'internalisation de nanoparticules par les cellules endothéliales, et des effets thérapeutiques des composés incorporés dans des nanoparticules. À cette fin, des études in vitro ont été réalisées dans les cellules endothéliales en culture et a été également suivre l'efficacité du ciblage des endothéliales vasculaires avec liposomes utilisant des modèles animaux de souris transgéniques qui développent l'athérosclérose (souris déficientes en ApoE). Les résultats in vitro et in vivo indiquent une liaison spécifique de liposomes destinés à VCAM-1 et que les liposomes obtenus peuvent ensuite être utilisées comme vecteurs de médicaments à l'endothélium couvrant plaques d'athérome.

En outre, les résultats préliminaires indiquent que AG490, à la fois encapsulé dans les nanoparticules de transporteur et libre contribuent à réduire l'adhérence des monocytes à l'endothélium activé par inhibition du chemin Jak2/STAT3 et l'effet de l'inhibiteur est augmenté par encapsulation dans nanovehicule.

Le chapitre II est axé sur l'obtention d'un nanosystème pour le transport spécifique d'agents thérapeutiques, capable de déstabiliser et de libérer contrôlée le composé encapsulé sur la surface de la cellule cible. Ces moyens de nanotransporteurs peuvent être transport efficace pour une libération contrôlée des antagonistes des récepteurs de chimiokines qui bloquent l'interaction chimiokine / chimiokine récepteurs de surface endothéliales activées et donc entraver la transmigration des leucocytes dans l'espace sous-endothélial.

Infiltration leucocytaire est fortement réglementée par les chimiokines. Les chimiokines sont des petits polypeptides, très spécialisés qui fonctionnent comme des régulateurs du trafic cellulaire à travers des interactions faites par G récepteurs couplés aux protéines à la surface des leucocytes. Dans notre recherche, nous avons étudié l'effet des antagonistes des récepteurs de chimiokines sur l'adhérence et l'infiltration des monocytes à travers monocouche endothéliale imitant conditions inflammatoires. En utilisant le système de xCELLigence, j'ai regardé en temps réel: 1) monocouche formant des cellules endothéliales, 2) l'effet dela cytokine pro-inflammatoire TNF-α sur les cellules endothéliales,

3) adhérence et l'infiltration des monocytes et 4) l'effet protecteur des antagonistes des récepteurs de chimiokines sur l'intégrité monocouche. Les données indiquent que le blocage des récepteurs des chimiokines CCR2 et CCR5 permet de réduire considérablement la transmigration travers l'endothélium, ceci étant réalisé grâce à une diminution de l'accumulation de monocytes dans la paroi du vaisseau sanguin et à réduire les processus inflammatoires. Cependant, les essais expérimentales et cliniques des inhibiteurs potentiels de chimiokines et leurs récepteurs pour le traitement des maladies inflammatoires,ont révélé des effets immunologiques latérale. Transport local de antagonistes des récepteurs de chimiokines dans certaines zones pourraient être une meilleure stratégie pour ralentir ou interrompre le processus inflammatoire. Conception des véhicules de transport pour être en mesure de «livrer» le médicament au site actif affecté est un moyen prometteur pour traiter l'inflammation. Ainsi, pour obtenir un bénéfice thérapeutique en ciblant l'activité endothéliale spécifique, nous avons conçu des liposomes cibles sensibles capables de libérer le composé encapsulé après la liaison au cible. Ils peuvent être transport efficace pour une libération contrôlée des antagonistes des récepteurs de chimiokines aux surface des endothéliales activées qui bloquent l'interaction chimiokine / chimiokine récepteurs et empêchent la transmigration des leucocytes dans l'espace sous-endothélial.

Dans le chapitre III, nous avons regardé fonctions de modulation de monocytes / macrophages en utilisant la nanotechnologie afin de réduire l'inflammation de la plaque d'athérome.

Les macrophages sont essentiels dans le processus inflammatoire qui accompagne l'athérogenèse, de la formation de stries de lipide aux processus à la rupture de plaque et les syndromes coronariens aigus. L'un des objectifs était de suivre la production d'une cytokine pro-inflammatoire récemment découvert, la résistine, par des monocytes humains en raison de leur exposition à la glucose élevé. Nous avons également étudié les mécanismes impliqués dans l'effet de l'administration de liposomes de clodronate (traitement conduit à l'épuisement des monocytes / macrophages) sur la viabilité des cellules paroi vasculaire (cellules endothéliales - CE, cellules musculaires lisses - CML) et les monocytes et les macrophages. Nous avons étudié les effets de l'interaction monocytes apoptotique des cellules de la paroi vasculaire en consultant d'adhésion des monocytes / macrophages aux cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et des changements survenus dans la prolifération (PCNA) et les voies de signalisation intracellulaires (MAPKinazele: p38 et ERK) dans cellules musculaires lisses. Les résultats montrent que: (1) des niveaux élevés de glucose induisent expression de la résistine chez monocytes l'homme U937 (ARNm et protéine), (2) MAPKinazele p38 ERK1

/ 2 et JNK et NF-kB facteur de transcription impliqué dans cette mécanisme, (3) l'insuline significativement réduit expression de la résistine induit par l'hyperglycémie indépendant de voies de signalisation MAP-kinase PI3K, ERK1 / 2 et p38.

Les expériences réalisées pour étudier les effets de l'administration de liposomes de clodronate sur les cellules de la paroi vasculaire et les monocytes / macrophages montrent que les petits liposomes unilamellaires sont prises prédilection par les cellules endothéliales et musculaires lisses, alors que des liposomes multilamellaires sont internalisées par les monocytes humains U937, les macrophages murins Raw 264.7 et les macrophages péritonéale isolées de souris. Études de faisabilité énumérés ci-dessus types de cellules ont montré que la viabilité des cellules endothéliales et musculaires lisses n'est pas significativement affectée par MLV et SUV encapsulé clodronate, alors que, en macrophages, l'activité biologique des clodronate encapsulé dans MLV est plus élevé que le clodronate libre avec une diminution significative de leur viabilité, le type de mort cellulaire induite par l'apoptose.

L'induction de l'apoptose dans les monocytes provoque des changements dans leurs interactions avec les cellules de la paroi vasculaire. La communication entre les cellules apoptotiques et les cellules musculaires lisses entraîne une diminution de la prolifération de 35% et de la phosphorylation MAP-Kinases p38 (~ 35%) et ERK (70%) dans les cellules musculaires. En outre, les monocytes a été induite l'apoptose par les liposomes de clodronate montrer une adhérence accrue de cellules de la paroi vasculaire par rapport à monocytes normaux.

Voici les résultats obtenus dans différents modèles expérimentaux pour induire l'inflammation et en utilisant différents types de nanotransporteurs, nous pouvons tirer les conclusions suivantes: 1) liposomes destinés à VCAM-1 sont capables de transporter médicaments à des cellules endothéliales activées, 2) nanoparticules lipidiques peut être utilisé pour le transport intracellulaire dans les cellules endothéliales des substances hydrophobes, 3) nanosystèmes de transport cible sensible développé peut fournir des agents thérapeutiques locales au voisinage de l'endothélium activé et 4) les liposomes peut être capable de transporter des substances actives pour moduler les fonctions des monocytes / macrophages dans réduire le processus inflammatoire.

Les études dans ce papier sont appliquées nature, le but ultime étant de contrôler et de réduire le processus inflammatoire en utilisant différentes stratégies thérapeutiques basées sur nanotransporteurs.

Nombre de figures dans la première partie – 17

Nombre de figures dans le texte original (partie II) – 40

Indications bibliographiques – 177

Articles publiés dans des revues internationales ISI – 10

Articles publiés dans des revues CNCSIS national – 2

Les résumés des communications présentées lors de réunions scientifiques internationales – 48

Les résumés des communications présentées lors de réunions scientifiques nationales - 6

Trainings et stages effectués – 4

Participation à des projets de recherche - 4 national, 2 internationaux.

ACADEMIA ROMANA

INSTITUTUL DE BIOLOGIE SI PATOLOGIE CELULARA

„NICOLAE SIMIONESCU”

TEZA DE DOCTORAT

Dezvoltarea de terapii anti-inflamatoare directionate folosind nanotransportori de medicamente

REZUMAT

Conducator stiintific:

Acad. MAYA SIMIONESCU

Doctorand:

STAN DANIELA

BUCURESTI

2013

CUPRINS

Cuvant inainte 8

Introducere si obiective 9

PARTEA I

Stadiul actual al cunostintelor privind utilizarea nanotransportorilor pentru realizarea unor terapii directionate anti-inflamatorii

1. Notiuni generale despre inflamatie 11

1.1. Molecule pro-inflamatorii secretate in inflamatie 12

1.1.1. Citokine 14

1.1.2. Chemokine 15

1.2. Recrutarea si transmigrarea leucocitelor la situsul inflamator 19

1.2.1. Molecule de adeziune implicate in adeziunea si transmigrarea leucocitelor 20

1.2.2. Procesul de transmigrare a leucocitelor 21

1.3. Incetarea procesului inflamator 23

1.4. Inflamatia cronica 26

1.4.1. Cauze 27

1.4.2. Rolul monocitelor/macrofagelor 28

1.4.3. Fibroza, caracteristica inflamatiei cronice 33

2. Utilizarea nanoterapiei in reducerea procesului inflamator 35

2.1. Introducere 35

2.2. Tipuri de transport al nanoparticulelor 37

2.3. Avantajele utilizarii nanosistemelor de transport tintite 40

2.4. Folosirea nanoparticulelor in terapia inflamatiei 41

2.4.1. Directionarea specifica a nanoparticulelor catre endoteliul activat 41

2.4.1.1. Tintirea moleculelor de adeziune: E-selectina, ICAM-1, VCAM-1, VLA-4 42

2.4.2. Transportul nanoparticulelor catre monocite/macrofage 47

- Marcarea monocitelor pentru studierea prin imagistica a proceselor pro-inflamatorii in atacul cerebral 47

- Transport de gene cu ajutorul nanoparticulelor catre monocite/macrofage pentru reducerea inflamatiei in artrita reumatoida 48

- Transport de gene cu ajutorul nanoparticulelor catre monocite/macrofage pentru reducerea inflamatiei in ateroscleroza 49

- Depletia monocite/macrofage 50

PARTEA aII-a CONTRIBUTII ORIGINALE

Abrevieri 52

I. Transportul tintit de nanocarausi de agenti terapeutici catre endoteliul vascular activat 54

I.1. Introducere si obiective 54

I.2. Materiale si metode 54

2.1. Prepararea diverselor tipuri de nanoparticule 54

2.1.1. Prepararea liposomilor 54

2.1.2. Prepararea nanoparticulelor lipidice 55

2.1.3. Cuplarea de liganzi la suprafata nanoparticulelor 57

2.2. Caracterizarea nanoparticulelor 59

2.2.1. Analiza nanoparticulelor prin microscopie electronica de transmisie 59

2.2.2. Determinarea dimensiunii nanoparticulelor prin imprastierea dinamica a luminii laser (DSL) 59

2.2.3. Determinarea eficientei de cuplare a liganzilor la suprafata liposomilor 60

2.2.3.1. Tehnica DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) 60

2.2.3.2. Tehnica HPLC (High-performance liquid chromatography) 61

2.3. Determinarea exprimarii moleculei de adeziune celulara VCAM-1 pe suprafata celulelor endoteliale activate 61

2.3.1. Tehnica ELISA 62

2.3.2. Metoda de citometrie in flux 62

2.4. Studiul legarii si internalizarii liposomilor de catre celulele endoteliale 63

2.5. Testarea capacitatii liposomilor directionati catre molecula VCAM-1 de a se lega specific la aorta soarecilor ApoE-deficienti 64

2.6. Urmarirea transportului intracelular al nanoparticulelor caraus de inhibitor de JAK2/STAT3 in celulele endoteliale 66

I.3. Rezultate 69

3.1. Caracterizarea nanoparticulelor 69

3.1.1. Microscopie electronica de transmisie 69

3.1.2. Dimensiunea nanoparticulelor prin imprastierea dinamica a luminii laser (DSL) 70

3.1.3. Eficienta de cuplare a liganzilor la suprafata liposomilor 71

3.2. Exprimarea moleculei de adeziune celulara VCAM-1 pe suprafata celulelor endoteliale activate 73

3.3. Legarea liposomilor la suprafata celulelor endoteliale 74

3.4. Capacitatea liposomilor directionati catre VCAM-1 de a se lega specific la aorta soarecilor ApoE-deficienti 76

3.5. Transportul intracelular al nanoparticulelor caraus de inhibitor de JAK2/STAT3 in celulele endoteliale 79

II. Dezvoltarea unui nanosistem pentru transportul specific de agenti terapeutici catre suprafata celulelor endoteliale activate in vederea inhibarii interactiunii chemokine-receptori 80

II.1. Introducere si obiective 80
II.2. Materiale si metode 82
2.1 Model experimental pentru studiul transmigrarii monocitelor prin monostratul de celule endoteliale 82
2.2. Prepararea liposomilor tinta-sensitivi directionati catre VCAM-1 84
2.3. Caracterizarea liposomilor tinta-sensitivi 85
2.4. Evaluarea stabilitatii liposomilor tinta-senzitivi 86
2.5. Determinarea legarii liposomilor tinta-senzitivi la suprafata celulelor endoteliale 87
2.6. Estimarea eliberarii markerului incorporat in liposomii tinta-senzitivi dupa legarea de suprafata celulelor endoteliale 88
2.7. Testarea capacitatii liposomilor tinta-senzitivi de a se lega specific de aorta soarecilor ApoE-deficienti 88
II.3. Rezultate 90
3.1. Efectul inhibarii interactiunii chemokine/receptori asupra transmigrarii monocitelor prin monostratul de celule endoteliale 90
3.2. Caracterizarea liposomilor tinta-senzitivi 95
3.2.1. Microscopie electronica de transmisie 95
3.2.2. Dimensiune si potential Zeta 95
3.3. Stabilitatea liposomilor tinta-senzitivi 97
3.3.1. Influenta temperaturii si a timpului de stocare asupra stabilitatii liposomilor tinta-senzitivi 97
3.3.2. Influenta serului asupra stabilitatii liposomilor tinta-senzitivi 98
3.4. Legarea liposomilor tinta-senzitivi la suprafata celulelor endoteliale 100
3.5. Eliberarea markerului incorporat in liposomii tinta-senzitivi dupa legarea de suprafata celulelor endoteliale 101

3.6. Legarea specifica a liposomilor tinta-senzitivi de aorta soarecilor ApoE-deficienti 103

III. Utilizarea nanotehnologiilor pentru modularea functiilor monocitelor/macrofagelor cu scopul de a reduce inflamatia placii aterosclerotice 104

III.1. Introducere si obiective 104
III.2. Materiale si metode 105
2.1. Determinarea productiei citokinei pro-inflamatoare, rezistina de catre monocitele expuse la concentratii crescute de glucoza 105
2.1.1.Determinarea exprimarii genice a rezistinei prin tehnica RT-PCR..... 108
2.1.2. Determinarea exprimarii proteice a rezistinei prin tehnica Western Blot 109
2.1.3.Detectia factorului de transcriptie NF-kB in fractia nucleara izolata din monocite 109
2.2. Determinarea interactiunii dintre liposomii cu clodronat si diverse tipuri celulare (monocite/macrofage, celulele peretelui vascular) 110
2.2.1. Obtinerea de liposomi cu clodronat 111
2.2.2. Determinarea internalizarii liposomilor multilamelari si unilamelari de catre diverse tipuri celulare 112
2.2.3. Evaluarea efectului incubarii cu diferite concentratii de liposomi cu clodronat asupra viabilitatii diverselor tipuri celulare 113
2.2.4. Investigarea apoptozei indusa de liposomi cu clodronat in diverse tipuri celulare 114
2.3. Inducerea apoptozei in monocite/macrofage cu ajutorul liposomilor cu clodronat si urmarirea efectelor interactiunii acestora cu celulele peretelui sangvin 115
2.3.1. Determinarea adeziunii monocitelor apoptotice la celulele peretelui vasului sangvin 116
2.3.2. Evaluarea efectului interactiunii dintre monocitele apoptotice si celulele musculare netede asupra cailor de semnalizare in celulele musculare netede 116
III.3. Rezultate 117

3.1. Concentratia crescuta de glucoza induce exprimarea genica si proteica de rezistina in monocite 117
3.2. Insulina reduce exprimarea genica si proteica de rezistina in monocitele expuse la concentratii crescute de glucoza 120
3.3. Interactiunea dintre liposomii cu clodronat si diverse tipuri celulare (monocite/macrofage, celulele peretelui vascular) 127
3.3.1. Internalizarea liposomilor cu clodronat de catre diverse tipuri celulare 127
3.3.2. Efectul incubarii cu diferite concentratii de liposomi cu clodronat asupra viabilitatii diverselor tipuri celulare 129
3.3.3. Apoptoza indusa de liposomi cu clodronat in diverse tipuri celulare 131
3.4. Inducerea apoptozei in monocite/macrofage cu ajutorul liposomilor cu clodronat si urmarirea efectelor interactiunii acestora cu celulele peretelui sangvin 133
3.4.1. Liposomii cu clodronat determina cresterea activitatii Caspazei-3 in monocite 133
3.4.2. Monocitele apoptotice prezinta o adezivitate crescuta la celulele peretelui vasului sangvin 134
3.4.3. Interactiunea monocite apoptotice-celule musculare netede moduleaza fosforilarea proteinelor ERK si p38 135
3.4.4. Interactiunea dintre monocite apoptotice si celulele musculare netede determina scaderea proliferarii acestora 136

Rezultate si concluzii 141
Bibliografie 143

Lista lucrari publicate 155
Lucrari publicate in reviste nationale recunoscute CNCSIS 156
Lista lucrarilor prezentate la manifestari stiintifice 156
Lucrari prezentate la manifestari internationale aparute in reviste de specialitate cotate ISI (proceedings) 156
Postere la manifestari stiintifice internationale 157

Postere la manifestari stiintifice nationale 164

Granturi 165

Cuvinte cheie: inflamatia, inflamatie acuta, inflamatie cronica, citokine, chemokine, celule endoteliale, celule musculare netede vasculare umane, monocite/macrofage, molecule de adeziune celulara, soareci apoE-deficienti, adeziune, transmigrare, nanoterapie, nanocarausi, nanoparticule lipidice, liposomi, antagonisti de receptori chemokinici, rezistina, MAPKinaze, clodronat, apoptoza.

Inflamatia este un mecanism al sistemului imun innascut facand parte dintr-un raspuns biologic complex al tesutului vascular la stimuli nocivi (patogeni, celule deteriorate, iritanti). Rezultatul final al procesului inflamator este de a proteja organismul de raspandirea unor infectii si restaurarea structurala si functionala a tesuturilor afectate. In functie de severitatea reactiei, inflamatia poate fi acuta, determinand in final eliminarea stimulilor inflamatori si revenirea tesutului la conditiile fiziologice, sau poate fi cronica ducand la exagerarea procesului inflamator si aparitia a diferite patologii. Inflamatia cronica este implicata in numeroase patologii printre care: ateroscleroza, cancer, artrita reumatoida, scleroza multipla, bolile intestinale inflamatorii, Alzheimer, lupus eritematos sistemic, alergii, etc.

Un rol important in procesul inflamator il are activarea endoteliului. In conditii normale, endoteliul vascular este non-trombogenic si non-aderent. Schimbari in micromediul inconjurator afecteaza celulele endoteliale care vor exprima molecule de adeziune (VCAM-1, ICAM-1, E- si P-selectina, fractalkina), care prin legare la receptorii corespunzatori de pe suprafata leucocitelor si plachetelor conduc la recrutarea si aderarea acestora la endoteliu. Pe langa moleculele de adeziune, celulele endoteliale exprima si chemokine precum MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5), fractalkina (CX3CL1) care se leaga la receptori omologi de pe suprafata leucocitelor si impreuna cu moleculele de adeziune contribuie la adeziunea si transmigrarea acestora. Chemokinele se leaga la glicozaminoglicanii prezenti pe membrana celulelor endoteliale si ghideaza intrarea leucocitelor in peretele arterial. Monocitele sunt

atrase de chemokinele CCL2, CCL5 şi CX3CL1 care activeaza receptorii CCR2, CCR5 şi CX3CR1 de pe monocite.

Datorita implicarii moleculelor de adeziune celulara si a chemokinelor in dezvoltarea bolilor cronice inflamatorii, interventia terapeutica deschide noi oportunitati pentru prevenirea si tratamentul acestor boli. Manipularea functionala a sistemului de chemokine, cum ar fi inhibarea interactiei chemokine/receptori chemokinici, prin utilizarea de antagonisti chemokinici (CA) sau antagonisti de receptori chemokinici (CRA) ar putea constitui o optiune terapeutica importanta pentru prevenirea acumularii de celule inflamatorii si agravarea unor boli (aterogeneza, metastazare). Un mod de abordare pentru a modula directionarea unui medicament catre un situs specific este de a concepe vehicule de transport care sa fie capabile sa "livreze" medicamentul la situsul afectat. Calea cea mai promitatoare pentru directionarea unor nanotransportori la situsuri specifice o reprezinta atasarea pe suprafata lor a unor liganzi care sa poata transporta substanta activa in celula sau sa recunoasca molecule tinta specifice.

Dat fiind asocierea inflamatiei cronice cu diverse boli si rolul jucat de adeziunea leucocitelor la endoteliu si migrarea subendoteliala, aceasta teza de doctorat si-a propus introducerea de diferite strategii terapeutice bazate pe nanoparticule cu scopul de a controla inflamatia si de a interfera in pasii de recrutare ai leucocitelor. In prima parte vor fi prezentate aspecte actuale cu privire la utilizarea nanoparticulelor pentru realizarea unor terapii directionate anti-inflamatorii. Partea originala a lucrarii se concentreaza pe (1) dezvoltarea unor nanotransportori de agenti terapeutici pentru realizarea unui transport tintit la endoteliul vascular activat cu scopul de a interfera selectiv cu disfunctia endoteliala sau de a inhiba interactiunea chemokine-receptori, pentru a preveni acumularea celulelor proinflamatorii in peretele vascular si (2) pe utilizarea nanoparticulelor pentru modularea functiilor monocitelor/macrofagelor cu scopul de a reduce inflamatia placii aterosclerotice.

Prima parte a tezei prezinta stadiul actual al cunostintelor si este organizata in 2 capitole.

Capitolul 1 prezinta notiuni generale despre procesul inflamator. Patrunderea de patogeni proveniti de la microorganisme sau molecule proprii alterate, determina declansarea unui raspuns inflamator acut caracterizat de infiltrarea de neutrofile in primele 6-24 de ore, dupa care, sunt inlocuite de monocite/macrofage. Are loc indepartarea agentului pro-inflamator cu vatamarea reversibila a tesutului colateral, indepartarea debriurilor celulare de catre macrofage si restaurarea homeostaziei tisulare cu refacerea completa a arhitecturii

tesutului initial. In cazul in care, nu este indus un raspuns inflamator corespunzator, stimulul persista, are loc infiltrarea de macrofage si limfocite care sintetizeaza citokine si chemokine ce amplifica raspunsul inflamator, determinand distrugeri tisulare ireversibile. Se produce fibrozarea – inlocuirea tesutului initial cu tesut conjunctiv. Inflamatia cronica este implicata in numeroase patologii precum: ateroscleroza, bolile pulmonare obstructive cronice, artrita reumatoida, scleroza multipla, cancer, obezitate, astm, boli intestinale inflamatorii, dar si boli neurodegenerative.

Capitolul 2 prezinta cateva notiuni introductive despre utilizarea nanoterapiei in reducerea procesului inflamator. Numeroase celule si mediatori, implicati in inflamatie, pot fi folositi ca markeri fie in tintire, fie in detectarea stadiului bolii.

Prezentarea pacientilor in stadiile tarzii ale bolii, incapacitatea unor organisme de a raspunde la modelele de terapie actuala, dar si imbunatatirea activitatii biologice prin incapsularea unor agenti farmacologici/medicamente in nanoparticule au condus la dezvoltarea unei noi strategii de terapie si diagnosticare – nanoteragnostic, care isi presupune atat diagnosticarea cat si tratarea pacientului.

Deoarece medicamentele neincorporate pot difuza usor din/in vasul de sange, conducand la o scadere a substantei active la locul afectat, s-a trecut la incapsularea lui in nanoparticule care, odata ce au parasit vasul sangvin nu se mai intorc datorita dimensiunii lor mari avand loc o acumulare progresiva la locul afectat. Adaugarea de peptide sau anticorpi la suprafata nanocarausilor, capabili sa recunoasca molecule exprimate de celulele afectate poate conduce la un transport directionat de substante active, in tesutul afectat.

In Partea a II a - "Contribuţ ii originale", sunt prezentate rezultatele obtinute din experimentele care au avut ca scop controlarea inflamatiei si posibilitatea de a interfera in pasii de recrutare ai leucocitelor. Astfel, lucrarea de fata s-a centralizat pe indeplinirea a trei mari obiective principale:

I. transportul tintit la endoteliul vascular activat utilizand nanotransportori de agenti terapeutici pentru a interfera selectiv cu disfunctia endoteliala,

II. dezvoltarea unui nanosistem pentru transportul specific de compusi la suprafata celulelor endoteliale activate in vederea inhibarii interactiunii chemokine-receptori, cu scopul de a preveni acumularea celulelor proinflamatorii in peretele vascular

III. utilizarea nanotehnologiei pentru modularea functiilor monocitelor/macrofagelor pentru a reduce inflamatia placii aterosclerotice.

In capitolul I am prezentat transportul tintit de nanocarausi cu agenti terapeutici catre endoteliul vascular activat. In inflamatie, endoteliul joaca un rol important. Expunerea excesiva si sustinuta la mediatori pro-inflamatori conduce la disfunctia endoteliala care se traduce, in parte, prin exprimarea pe suprafata a moleculelor de adeziune celulara (ex: E- si P- selectina, VCAM-1 si ICAM-1) care mediaza recrutarea si adeziunea leucocitelor la endoteliu. Inducerea sau exprimarea crescuta de molecule specifice ofera oportunitati pentru transportul selectiv de agenti terapeutici la endoteliul afectat dintr-un anumit segment vascular. Pentru realizarea unui transport selectiv la endoteliul vascular activat, au fost folosite diferite nanosisteme de transport (liposomi, nanoparticule lipidice) si s-a evaluat capacitatea de tintire a nanotransportorilor la endoteliul vascular activat comparativ cu endoteliul normal, eficienta de internalizare a nanoparticulelor de catre celulele endoteliale, precum si efectele terapeutice ale compusului incorporat in nanoparticule. In acest scop, s-au realizat studii in vitro pe culturi de celule endoteliale si de asemenea a fost urmarita eficienta de tintire a endoteliului vascular cu ajutorul liposomilor folosind modele animale de soareci transgenici care dezvolta ateroscleroza (soareci ApoE-deficienti). Rezultatele obtinute atat in vitro cat si in vivo indica o legare specifica a liposomilor directionati catre VCAM-1 si faptul ca liposomii obtinuti pot fi folositi in continuare ca transportori de medicamente la endoteliul ce acopera placa ateromatoasa.

De asemenea, rezultatele preliminare arata faptul ca AG490, atat incapsulat in nanoparticule transportoare cat si liber, contribuie la scaderea adeziunii monocitelor la endoteliul activat prin inhibarea caii Jak2/STAT3, iar efectul inhibitorului este crescut prin incapsularea in nanovehicule.

Capitolul al II-lea este axat pe obtinerea unui nanosistem pentru transportul specific de agenti terapeutici, capabil sa se destabilizeze si sa elibereze controlat compusul incorporat, la suprafata celulei tinta. Acesti nanotransportori pot constitui vehicule de transport eficiente pentru o eliberare controlata de antagonisti de receptori chemokinici la suprafata endoteliului activat care sa blocheze interactia chemokine/receptori chemokinici si sa impiedice astfel, transmigrarea leucocitelor in spatiul subendotelial.

Infiltrarea leucocitelor este puternic reglata de chemokine. Chemokinele sunt polipeptide mici, inalt specializate, care functioneaza ca reglatori ai traficului celular prin interactiunile realizate cu receptorii cuplati cu proteina G de pe suprafata leucocitelor. In cercetarile noastre am studiat efectul unor antagonisti de receptori chemokinici asupra adeziunii si infiltrarii monocitelor prin monostratul de celule endoteliale mimand conditiile

inflamatorii. Utilizand sistemul Xcelligence, am urmarit in timp real: 1) formarea monostratului de celule endoteliale; 2) efectul citokinei pro-inflamatorii TNF-α asupra celulelor endoteliale; 3) adeziunea si infiltrarea monocitelor si 4) efectul protector al antagonistilor de receptori chemokinici asupra integritatii monostratului. Datele indica faptul ca, blocarea receptorilor chemokinici CCR2 si CCR5 poate reduce semnificativ transmigrarea prin endoteliu, aceasta realizandu-se printr-o descrestere a acumularii monocitelor in peretele vasului sangvin si reducerea procesului inflamator. Insa, testarea experimentala si clinica a unor potentiali inhibitori de chemokine si ai receptorilor lor pentru tratamentul bolilor inflamatorii, au evidentiat efecte imunologice secundare. Transportul local de antagonisti de receptori chemokinici in anumite zone poate constitui o strategie mai buna pentru a incetini sau intrerupe procesul inflamator. Conceperea de vehicule de transport care sa fie capabile sa "livreze" medicamentul la situsul afectat este o cale promitatoare in tratarea inflamatiei. Astfel, pentru a obtine un beneficiu terapeutic prin tintirea specifica a endoteliului activat, am conceput liposomi tinta senzitivi capabili sa elibereze compusul incorporat dupa legarea la tinta. Acestia pot constitui vehicule de transport eficiente pentru o eliberare controlata de antagonisti de receptori chemokinici la suprafata endoteliului activat care sa blocheze interactia chemokine/receptori chemokinici si sa impiedice transmigrarea leucocitelor in spatiul subendotelial.

In capitolul al III-lea am urmarit modularea functiilor monocitelor/macrofagelor folosind nanotehnologia, cu scopul de a reduce inflamatia placii aterosclerotice.

Macrofagele sunt esentiale in procesul inflamator care insoteste aterogeneza, incepand de la formarea striurilor lipidice pana la procesele ce duc la ruptura placii si la sindroame coronariene acute. Unul din obiective a fost sa urmarim productia unei citokine proinflamatoare recent descoperita, rezistina, de catre monocitele umane ca urmare a expunerii lor la concentratii crescute de glucoza. De asemenea, am investigat mecanismele implicate in efectul administrarii de liposomi cu clodronat (tratament ce conduce la depletia monocitelor/macrofagelor) asupra viabilitatii celulelor peretelui vascular (celulele endoteliale-CE si celulele musculare netede-CMN) si a monocitelor si macrofagelor. Am studiat efectele interactiunii monocitelor apoptotice cu celulele peretelui vascular uitandu-ne la adeziunea monocitelor/macrofagelor la celulele endoteliale, celulele musculare netede, precum si modificarile ce apar in proliferare (PCNA) si in caile de semnalizare intracelulara (MAPKinazele: p38 si ERK) din celulele musculare netede.

Rezultatele obtinute arata faptul ca: (1) concentratia crescuta de glucoza induce semnificativ exprimarea rezistinei in monocitele umane U937 (ARNm si proteina); (2) MAPKinazele p38, ERK1/2 si JNK precum si factorul de transcriptie NF-kB sunt implicati in acest mecanism; (3) insulina reduce semnificativ expresia de rezistina indusa de glucoza crescuta, independent de caile de semnalizare MAPKinazice PI3K, ERK1/2 sau p38.

Experimentele realizate pentru studiul efectelor administrarii de liposomi cu clodronat asupra celulelor peretelui vascular si a monocitelor/macrofagelor arata faptul ca liposomii unilamelari mici sunt preluati in special de catre celulele endoteliale si musculare netede, pe cand liposomii multilamelari sunt internalizati de catre monocitele umane U937, macrofagele murine Raw 264.7 si macrofage peritoneale izolate de la soareci. Studiile de viabilitate pe tipurile celulare enumerate mai sus au aratat ca viabilitatea celulelor endoteliale si musculare netede nu este afectata semnificativ de MLV si SUV cu clodronat incapsulat, pe cand, in cazul macrofagelor activitatea biologica a clodronatului incapsulat in MLV este mai mare comparativ cu clodronatul liber avand loc o scadere semnificativa a viabilitatii lor, tipul de moarte celulara indusa fiind apoptoza.

Inducerea apoptozei in monocite determina schimbari in interactiunile lor cu celulele peretelui vascular. Comunicarea dintre celulele apoptotice si celulele musculare netede determina o scadere a proliferarii cu 35% si a fosforilarii MAPKinazelor p 38 (~35%) si ERK (70%) in celulele musculare. De asemenea, monocitele in care a fost indusa apoptoza cu ajutorul liposomilor cu clodronat manifesta o adeziune crescuta la celulele peretelui sangvin in comparatie cu monocitele normale.

In urma rezultatelor obtinute pe diverse modele experimentale in care s-a indus inflamatia si folosindu-se diferite tipuri de nanotransportori, se pot trage urmatoarele concluzii generale: 1) liposomii directionati catre VCAM-1 sunt capabili sa transporte medicamente la CE activate, 2) nanoparticulele lipidice pot fi folosite pentru transportul intracelular in celule endoteliale a substantelor hidrofobe, 3) nanosistemul de transport tinta senzitiv dezvoltat poate furniza local agenti terapeutici, in vecinatatea endoteliului vascular activat si 4) liposomii pot fi capabili sa transporte substante active pentru modularea functiilor monocitelor /macrofagelor in scopul reducerii procesului inflamator.

Studiile efectuate in acesta lucrare sunt de natura aplicativa, scopul final fiind acela de a controla si reduce procesul inflamator utilizand diferite strategii terapeutice bazate pe nanotransportori.

Numar de figuri in prima parte – 17

Numar de figuri in partea originala (Partea a II-a) – 40

Indicatii bibliografice – 177

Lucrari publicate in reviste internationale cotate ISI – 10

Lucrari publicate in reviste nationale recunoscute CNCSIS – 2

Rezumate ale lucrarilor prezentate la manifestari stiintifice internationale – 48

Rezumate ale lucrarilor prezentate la manifestari stiintifice nationale - 6

Specializari si cursuri efectuate – 4

Participarea la proiecte de cercetare – 4 nationale, 2 internationale.

12 iunie 2026

COMUNICAT DE PRESĂ

„PNRR: Fonduri pentru România modernă și reformată!”

Finalizarea proiectului STROMA: *Consolidarea competenței românești în cercetarea sindromului metabolic prin explorarea rolului apolipoproteinei A2 în dislipidemie, obezitate și diabet zaharat de tip II*

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” a finalizat cu succes proiectul ***„Consolidarea competenței românești în cercetarea sindromului metabolic prin explorarea rolului apolipoproteinei A2 în dislipidemie, obezitate și diabet zaharat de tip II” acronim STROMA***, cod proiect PNRR-III-C9-2022-I8-258, contract nr. 760060/23.05.2023, finanțat prin Planul Național de Redresare și Reziliență al României.

Proiectul a fost implementat în perioada 1 iulie 2023 – 30 iunie 2026, la sediul Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” din București, de către membrii laboratorului de Reglare Genică și Terapii Moleculare sub coordonarea Dr. Kyriakos E. Kypreos.

Valoarea totală a proiectului a fost de 7.000.000 lei (7.606.842,14 lei cu TVA).

Proiectul STROMA a fost lansat pentru a determina exact cum o anumită proteină din sânge, numită apolipoproteina A2, influențează modul în care organismul nostru gestionează grăsimile și glucoza atunci când ne confruntăm cu o boală. Proiectul a examinat modul în care această proteină modifică traiectoria grăsimilor prin fluxul sanguin și cum alterează compoziția și eficacitatea HDL, care este colesterolul nostru „bun”. În același timp, cercetătorii au analizat modul în care proteina influențează capacitatea organismului nostru de a menține nivelurile de glucoză din sânge stabile și cum modifică modul în care grăsimea corporală stochează și arde energia. În cele din urmă, cercetătorii au integrat rezultatele pentru a înțelege modul în care această proteină influențează colesterolul, greutatea și diabetul. Dincolo de obiectivele științifice imediate, proiectul a reușit să pună bazele solide pentru o linie de cercetare nouă și durabilă pentru anii următori. Prin introducerea unor metodologii avansate și extinderea expertizei instituționale, STROMA a consolidat semnificativ potențialul de cercetare pe termen lung și capacitatea competitivă a institutului beneficiar în domeniul cercetării cardiovasculare.

Pe baza cunoștințelor dobândite, STROMA avansează semnificativ cercetarea translațională în domeniul bolilor metabolice și stabilește o bază științifică riguroasă pentru dezvoltarea de strategii terapeutice inovatoare care vizează bolile cardiovasculare.

Detalii suplimentare se pot obține de la:

Persoană de contact: Dr. Anca Gafencu

Funcție: Cercetător Principal, Coordonator științific local

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

Tel.: 021.319.45.18, Fax: 021.319.45.19, e-mail: anca.gafencu@icbp.ro

„Conținutul acestui material nu reprezintă în mod obligatoriu poziția oficială a Uniunii Europene sau a Guvernului României”

„PNRR. Finanțat de Uniunea Europeană - UrmătoareaGenerațieUE”

Website – https://mfe.gov.ro/pnrr/ Facebook – https://www.facebook.com/PNRROficial/

ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE

INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ

„NICOLAE SIMIONESCU”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

cu titlul

„Efectul stimulării cu hormoni estrogeni al celulelor stem obținute din sânge de cordon ombilical și gelatina Wharton asupra regenerării țesutului cardiac ”

Susținută în data de 30.07.2020,

Aula George Emil Palade, Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

Conducător științific:

Acad. MAYA SIMIONESCU

Doctorand:

MARIA-CRISTINA MIHAI (COROTCHI)

Teza de doctorat poate fi consultată la Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

CUPRINS

Cuvânt înainte 1

Listă abrevieri 2

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTINȚELOR 7

I.1. Hormonii estrogeni 7

I.1.1. Descrierea și efectele biologice ale estrogenilor 7

I.1.2. Procesul de sinteză și metabolismul estrogenilor 8

I.2. Receptorii estrogeni 10

I.2.1. Mecanisme de acțiune a receptorilor estrogenici (ERs) 12

I.2.1.1. Mecanismul genomic sau „clasic" de acțiune al receptorilor estrogenici 12

I.2.1.2. Mecanismul alternativ de acțiune non-genomică al receptorilor estrogenici 12

I.3. Boala cardiovasculară și necesitatea regenerării cardiace 15

I.3.1. Ateroscleroza 15

I.3.2. Terapia de substituție hormonală, menopauza și bolile cardiovasculare 17

I.4. Inductori ai regenerării vasculare în bolile cardiovasculare 18

I.4.1. Introducere în lumea celulelor stem 18

I.4.2. Celulele stem mezenchimale (MSCs) 21

I.4.2.1. Scurt istoric al apariției celulelor stem mezenchimale în lumea științifică 21

I.4.2.2. Celulele stem mezenchimale derivate din gelatina Wharton (Wharton's jelly - WJ) 21

I.4.2.3. Bolile cardiovasculare: terapia cu MSCs și conexiunea MSCs cu estrogenii 25

I.4.3. Celule endoteliale progenitoare (EPCs) 29

I.4.3.1. Scurtă descriere istorică a apariției și evoluției celulelor endoteliale progenitoare 29

I.4.3.2. Celule endoteliale progenitoare derivate din sângele cordonului ombilical 30

I.4.3.3. Celulele endoteliale progenitoare, estrogenii și implicarea lor în mecanismul de regenerare după ischemie 33

II. CONTRIBUTII ORIGINALE 40

II.1. Efectul 17-beta estradiolului (E2) asupra celulelor stem mezenchimale (MSCs) demonstrate prin studii *in vitro* 40

II.1.1. Introducere și obiective 40

II.1.2. Materiale și metode 43

II.1.2.1. Izolarea celulelor stem mezenchimale din gelatina Wharton (WJ) 43

II.1.2.1.1. Caracterizarea și diferențierea celulelor stem mezenchimale 44

II.1.2.1.2. Caracterizarea imunofenotipică a MSCs prin tehnica de citometrie în flux 47

II.1.2.2. Testarea caracterului citotoxic, adeziunii, viabilității și proliferării MSCs după tratamentul cu hormonul sexual, E2 48

II.1.2.3. Caracterizarea imunofenotipică a MSCs stimulate cu E2 49

II.1.2.4. Analiza cantitativă PCR în timp real (qRT-PCR) 50

II.1.2.5. Tehnica Western blot – determinarea expresiei proteice 50

II.1.2.6. Eliberarea de oxid nitric (NO) a MSCs stimulate cu E2 51

II.1.2.7. Analiza proteomică a MSCs după expunerea la hormonul sexual E2 52

II.2. Studii *ex-vivo*: efectele 17-beta estradiolului (E2) exercitate asupra integrării și migrării celulelor stem mezenchimale (MSCs) în țesutul cardiac lezat 54

II.2.1. Introducere si obiective 54

II.2.2. Materiale si metode 55

II.2.2.1. Stabilirea condițiilor optime de obținere a țesuturilor cardiace murine. Teste de viabilitate 55

II.2.2.2. Evaluarea interacțiunii și răspunsului chemotactic al MSCs cu secțiunile de țesut cardiac prin sistemul de analiză în timp real - xCELLigence 57

II.2.2.3. Evaluarea integrării MSCs în secțiunile de țesut cardiac prin tehnica de imunohistochimie 58

II.2.2.4. Detectarea proteinelor MMP-2, MMP-9, Angiogenin (ANG), și VEGF secretate în mediul recoltat obținut în urma sistemului de co-cultură indirectă dintre MSCs ± E2 și secțiunile de țesut cardiac 59

II.3. Studii *in vivo*: stimularea MSCs cu E2 duce la inițierea procesului de neovascularizare/angiogeneză după ovariectomizare la șoarecii C57Bl/6 59

II.3.1. Introducere si obiective 59

II.3.2. Materiale si metode 61

II.3.2.1. Modelul C57Bl/6 ovariectomizat (OVX) 61

II.3.2.2. Tehnica ELISA 64

II.3.2.3. Tehnica de angiogeneză *in vivo*: studiul formțiunilor de Matrigel sau "Matrigel plugs" implantate la femelele C57Bl/6 64

II.3.2.4. Analiza proteomică a implanturilor de Matrigel 66

II.4. Analiza statistică 68

II.5. Rezultate 69

II.5.1. Efectele 17-beta estradiolului (E2) asupra celulelor stem mezenchimale demonstrate prin studii *in vitro* 69

II.5.2. Studii *ex-vivo*: efectele 17-beta estradiolului (E2) exercitate asupra integrării și migrării celulelor stem mezenchimale în țesutul cardiac lezat 92

II.5.3. Studii *in vivo*: stimularea celulelor stem mezenchimale cu E2 conduce la inițierea procesului de neovascularizare/angiogeneză după ovariectomizare (model experimental *in vivo)* 102

II.6. Discuții și concluzii parțiale 111

II.7. Efectul 17-beta estradiolului (E2) asupra celulelor endoteliale progenitoare (EPCs) - studii *in vitro* și *ex-vivo* 127

II.7.1. Introducere și obiective 127

II.7.2. Materiale și metode 134

II.7.2.1. Izolarea celulelor endoteliale progenitoare din sângele din cordonul ombilical (UCB) 134

II.7.2.1.1. Caracterizarea celulelor endoteliale progenitoare 135

II.7.2.2. Testarea caracterului citotoxic, adeziunii, viabilității și proliferării celulelor endoteliale progenitoare după tratamentul cu hormonul sexual, E2 137

II.7.2.3. Caracterizarea imunofenotipică a celulelor endoteliale progenitoare stimulate cu E2 138

II.7.2.4. Analiza cantitativă PCR în timp real (qRT-PCR) 138

II.7.2.5. Tehnica Western blot – determinarea expresiei proteice 139

II.7.2.6. Analiza prin spectrometrie de masă (LC-MS) a EPCs supuse tratamentului cu E2 140

II.8. "Scratch Wound Healing Assay" aplicată EPCs supuse tratamentului cu E2. Folosirea unui sistem brevetat de noi pentru măsurarea în timp real a deplasării celulelor *in vitro* folosind impedanța celulară și un dispozitiv separator original aplicat pentru modificarea plăcii de cultură celulară 141

II.9. Testarea efectelor estrogenilor asupra EPCs. Identificarea și evaluarea receptorilor hormonali; inducerea stresului oxidativ la EPCs 146

II.9.1. Detectarea receptorilor estrogeni (ERs) pe celulele endoteliale progenitoare 146

II.9.2. Tehnica Matrigel: evaluarea formării structurilor tubilor vasculari în urma stimulării cu hormoni sexuali a celulelor endoteliale progenitoare. 146

II.10. Studii *ex-vivo*: efectele 17-beta estradiolului (E2) exercitate asupra integrării și migrării celulelor endoteliale progenitoare în țesutul cardiac lezat 148

II.10.1. Introducere și obiective 148

II.10.2. Materiale și metode 149

II.10.2.1. Obținerea secțiunilor de țesut cardiac murin. Testul MTT 149

II.10.2.2. Analiza în timp real a procesului de chemotaxie a celulelor endoteliale progenitoare către secțiunile de țesut cardiac - sistemul CIM-plate xCELLigence 151

II.10.2.3. Analiza imunohistochimică a încorporării EPCs ± E2 în secțiunile de țesut cardiac 151

II.10.2.4. Detectarea proteinelor Angiogenin (ANG), VEGF și PlGF secretate în mediul de cultură de către celulele endoteliale progenitoare stimulate cu E2 după contact indirect cu țesutul cardiac (co-cultură indirectă) 153

II.11. Analiza statistică a rezultatelor 153

II.12. Rezultate 154

II.12.1. Efectul 17-beta estradiolului (E2) asupra EPCs demonstrate prin studii *in vitro* 154

II.12.2. "Scratch Wound Healing Assay" aplicată EPCs supuse tratamentului cu hormonul sexual – sistem brevetat de noi 166

II.12.3. Testarea efectelor estrogenilor asupra celulelor endoteliale progenitoare. Identificarea și evaluarea receptorilor hormonali 169

II.12.4. Efectele 17-beta estradiolului (E2) asupra integrării și migrării celulelor endoteliale progenitoare în țesutul cardiac lezat; studii *ex-vivo* 172

II.13. Discuții și concluzii parțiale 176

CONCLUZII GENERALE **186**

PERSPECTIVE **190**

BIBLIOGRAFIE **192**

Cuvinte cheie: Celule stem mezenchimale, celule endoteliale progenitoare, hormonii estrogeni, 17-beta estradiol, receptori pentru estrogeni (alfa și beta), terapii celulare, boli cardiovasculare, sânge placentar, gelatina Wharton, secțiuni de țesut cardiac.

Număr total de pagini – 220

Număr de figuri în partea I – „Stadiul actual al cunoștințelor" – 11

Număr de figuri în partea a II-a – „Contribuții originale" – 57

Număr tabele – 3

Indicații bibliografice – 210

Lucrări publicate în reviste internaționale indexate ISI – 6 (4 autor principal)

Lucrări publicate în reviste internaționale indexate BDI – 1 (1 co-autor)

Brevete naționale – 2

Rezumate publicate în reviste indexate ISI – 1 (autor principal)

Rezumate publicate în reviste indexate BDI – 1 (autor principal)

Lucrări în pregătire – 3

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – 9 (5 autor principal)

Comunicări orele susținute la manifestări științifice naționale – 1 (1 autor principal)

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale – 20 (17 autor principal)

Postere prezentate la manifestări științifice naționale – 1 (1 autor principal)

Cursuri și specializări – 8

Premii internaționale – 2

Premii naționale – 7

Burse obținute pe durata programului doctoral – 4

Participarea la proiecte de cercetare internaționale/naționale – 8

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Hormonii sunt definiți ca fiind substanțe chimice elaborate de o celulă sau grup de celule specializate (numite celule endocrine) și care sunt transportate prin sistemul circulator la o celulă țintă care răspunde printr-o modificare a funcției sale.[1]

Estrogenii sau Oestrogenii, sunt un grup de compuși din clasa hormonilor steroidici ce și-au primit denumirea în funcție de importanța lor atât în ciclul menstrual cât și în ciclul reproductiv. În organismul uman, estrogenii se găsesc sub trei forme: estradiol (produși de către ovare), estrone (produși în timpul menopauzei) și estriol (produși de către placentă).

În afara de protecția ce o oferă sistemului reproducător, hormonii estrogeni sunt cunoscuți a fi benefici și pentru alte organe și țesuturi. Efectele benefice ale estrogenilor s-au observat în creier (oferă neuroprotecție în cazul bolii Alzheimer), în ficat (reglarea colesterolului și a lipoproteinelor), la oase (previne apariția osteoporozei), în piele (combate îmbătrânirea) și poate reduce riscul cancerului de colon. [2,3]

De asemenea, s-a demonstrat că, estrogenii exercită efecte protectoare și asupra sistemului cardiovascular, asupra procesului de ischemie/reperfuzie, asupra țesutului cardiac lezat în urma unui infarct miocardic.[4,5]

Corpul uman produce trei forme de hormoni estrogeni, și anume estradiol (E2, $C_{18}H_{24}O_2$), estronă (E1, $C_{18}H_{22}O_2$) și estriol (E3, $C_{18}H_{24}O_3$). Cea mai studiată formă dintre cele 3 menționate anterior, este 17-beta estradiolul (E2), fiind și principalul contributor la activitatea estrogenică a femeilor aflate în perioada de pre-menopauză.

Pentru a-și exercita funcțiile biologice, hormonii estrogeni se leagă la situsuri de recunoaștere specifice numite **receptori.** Existența unui receptor estrogenic a fost demonstrată de Elwood Jensen în 1958, iar gena corespunzătoare a fost clonată tocmai în anul 1985.[6]

Mortalitatea cauzată de bolile cardiovasculare este rară în cazul femeilor aflate în pre-menopauză. Bărbații cu vârstă similară în comparație cu femeile aflate la pre-menopauză, prezintă un risc mai mare de a dezvolta hipertensiune arterială, precum și alte afecțiuni cardiovasculare (exemplu: boala arterială coronariană), însă, în cazul femeilor situația este diferită atunci când se instalează menopauza sau deja se afla la post-menopauză.

Mai multe studii observaționale și unele studii clinice efectuate la femei aflate la post-menopauză susțin ipoteza cu privire la E2 că este hormonul sexual ce acționează ca un "protector" al sistemului cardiovascular și circulator.[7,8]

Pe de altă parte, progrese continue se înregistrează în terapiile destinate regenerării țesuturilor ce folosesc celule stem pluripotente adulte/precursoare pentru a reconstrui sau regenera diferite țesuturi.

Domeniul celulelor stem mezenchimale (MSCs) a înregistrat progrese considerabile în ultimul deceniu, iar în rândul surselor multiple de celule stem, MSCs derivate din matricea ombilicală umană, și anume, gelatina Wharton (WJ), au fost propuse ca o nouă sursă potențială de celule care pot fi utilizate pentru tratamentul bolilor cardiovasculare (CVD) și în cazul terapiilor pentru cancer.[9]

Datorită descoperirii caracteristicilor excepționale ale MSCs și a încurajării de a implica MSCs atât în studii pre-clinice cât și clinice, se acceptă acum pe scară largă faptul că MSCs vor oferi un avantaj revoluționar în viitorul apropiat în intervenția terapeutică a diferitelor boli sau în regenerarea țesuturilor.

Rezultatele multiplelor studii clinice și pe animale (dar nu toate) au evidențiat potențialul de îmbunătățire a neovascularizării, reducerea cicatricilor și recuperarea funcțională atunci când se folosesc MSCs. Mai mult, modelele *in vitro* și *in vivo* sugerează că MSCs grăbesc angiogeneza post-ischemică și formarea vaselor de sânge. [25]

Cu toate acestea, o capcană majoră a terapiei cu MSCs este grefarea scăzută a celulelor transplantate în zonele infarctizate, adică circa 0,5% din MSCs transplantate au rămas în miocard după 4 zile.[10] Deși calea de administrare, adică intravasculară sau intra-cardiacă, poate explica diferențele, grefarea sau integrarea MSCs rămâne procentual scăzută (între 1-3%).[11]

Deficiențele profunde în înțelegerea mecanistică a reparațiilor și regenerării cardiace mediate de MSCs rămân încă un obstacol în avansarea, optimizarea și implementarea terapiei cu acest tip de celule.

Constatările de mai sus evidențiază nevoia crescută de optimizare a terapiei cu MSCs. În plus, identificarea moleculelor speciale pentru a putea pre-condiționa MSCs în scopul creșterii eficienței lor de adaptare și retenție și de a migra sau a fi redirecționate către locul potrivit (leziune sau țesut ischemic) rămâne o mare provocare, însă reprezintă și o caracteristică importantă pentru regenerarea țesutului sau organului respectiv .[12]

În sistemul reproductiv, estradiolul declanșează remodelarea țesuturilor, prin urmare, este posibil ca acest hormon sexual să faciliteze procesele de protecție, inclusiv repararea leziunilor ischemice. Se presupune că estrogenii pot facilita procesele biochimice și celulare în MSCs, generând factori paracrini, care facilitează grefarea și integrarea MSCs, astfel, ajutând la repararea cardiacă.

Un alt tip de celule cu potențial angiogenic sunt celulele endoteliale progenitoare (EPCs) obținute fie din surse fetale, fie din sânge periferic.

EPCs au fost descrise pentru prima dată de către Asahara et al [20] ca fiind celule $CD34^+$, care sunt capabile să participe la procesele de vasculogeneză; de atunci, biologia EPCs a câștigat o atenție deosebită și rapidă.

Pentru a recrea un endoteliu sănătos, este necesar a se lua în considerare o sursă exogenă de EPCs mai tinere și mai sănătoase. Pentru a atinge acest obiectiv, EPCs derivate din sângele din cordonul ombilical ar putea reprezenta candidații potriviți pentru re-endotelializarea vaselor cărora li s-a aplicat un tratament vascular sau au suferit o leziune.

Aceste tipuri noi de celule endoteliale sunt relativ ușor de obținut, au un potențial proliferativ ridicat, sunt potrivite pentru transplant și posedă o toleranță imună care permite transplantarea cu succes în ciuda disparității antigenului leucocitelor umane (HLA), sau se pot potrivi de la donator la pacientul primitor prin utilizarea HLA-urilor prezente și cunoscute.[14,15]

iCelulele din sângele cordonului ombilical pot, de asemenea, să se dividă și să formeze un număr de celule de 100 de ori mai mare comparativ cu numărul de celule obținut din sângele periferic, și să aibă o cantitate semnificativ mai mare de activitate telomerazică.[16]

Motivele posibile pentru care nivelurile de EPCs scad odată cu vârsta includ o capacitate redusă de a se mobiliza sau de a se diferenția și/sau epuizarea celulelor stem/progenitoare din măduva osoasă. EPCs pot avea o sensibilitate crescută la apoptoză din cauza unui dezechilibru între factorii pro- și anti-apoptotici și/sau scăderea apărării împotriva radicalilor liberi. Dovezi recente au arătat că EPCs derivate din măduva osoasă sunt direcționate spre locurile cu leziuni vasculare și aderă la peretele vascular rănit pentru a recrea un strat endotelial intact.[17,18] Creșterea numărului de EPCs circulante după administrarea de statine, estrogen, VEGF, G-CSF și efectuarea exercițiilor fizice, au arătat o re-endotelializare îmbunătățită după lezarea vasculară.[19,20]

De asemenea, odată cu trecerea anilor, studii recente au arătat că procesul de îmbătrânire este mediat de către 17-beta estradiol. Acest hormon sexual a demonstrat efectele sale benefice prin reducerea senescenței EPCs datorită scăderii receptorului angiotensinei de tip 1[21] și prin promovarea activității telomerazei.[22]

Luând în considerare datele existente în literatura de specialitate, **scopul** acestui proiect cuprins în teza de doctorat a fost evaluarea rolului hormonului estrogenic 17-beta estradiol (E2) asupra adeziunii, proliferării, migrării și încorporării în țesutul cardiac a celulelor stem obținute din sânge de cordon ombilical (celule endoteliale progenitoare) și din gelatina Wharton (celule

stem mezenchimale) și descifrarea mecanismelor moleculare implicate în procesele de angiogeneză, remodelare și regenerare tisulară folosind sisteme *in vitro*, *ex-vivo* și *in vivo*.

Prezenta teză de doctorat conține **2 studii majore**.

În **prima parte** a tezei de doctorat - **Stadiul actual al cunoștințelor** - organizată în 4 capitole, sunt prezentate noțiuni teoretice referitoare la caracterizarea, efectele biologice și mecanismele de acțiune ale estrogenilor și receptorilor estrogenici. De asemenea, sunt prezentate posibilitățile terapeutice existente, dar și necesitatea dezvoltării unor noi strategii terapeutice ce implică utilizarea unor tipuri de celule stem considerate posibili agenți terapeutici în bolile cardiovasculare.

În a doua parte a lucrării de doctorat - **Contribuții originale** - cercetările noastre au fost concentrate în două studii majore legate de efectul E2 asupra proliferării, migrării/integrării MSCs sau EPCs în regenerarea țesutului cardiac (studii *in vitro, ex vivo* și *in vivo*).

Deoarece estrogenii stimulează creșterea și activitatea celulelor cardiovasculare[23,24], împreună cu faptul că promovează creșterea și angiogeneza în celulele endoteliale progenitoare și în celulele stem[25,26], **primul nostru obiectiv** a fost să identificăm dacă E2 poate facilita/crește adeziunea și proliferarea MSCs/EPCs și dacă caracterul de celulă stem al MSCs/EPCs este păstrat și după tratamentul cu hormonul sexual. Pentru a atinge acest obiectiv, în primul rând, am izolat și caracterizat MSCs/EPCs din gelatina Wharton și sângele cordonului ombilical, apoi am testat concentrația optimă de E2 pentru aceste tipuri de celule stem.

Recent, rezultatele multor studii oferă dovezi că E2 influențează biologia și fiziologia vasului de sânge și a inimii, prin interacțiunea directă cu celulele vaselor de sânge (celulele musculare netede, celulele endoteliale) și cu a celulelor existente în inima (miocite și fibroblaste) prin intermediul receptorilor estrogenici (ERs), ER-alfa și ER-beta. Prin urmare, **cel de-al doilea obiectiv** a fost de a elucida rolul celor doi ERs, în medierea efectelor anterior menționate.

Mai mult, **al treilea obiectiv** a fost acela de a examina prin analiza proteomică potențialele procese pro-reparatorii, căile și mecanismele afectate de modificările pe care le-ar putea provoca E2 în MSCs după tratamentul adecvat cu acest hormon.

Un **al patrulea obiectiv**, l-a constituit confirmarea și/sau validarea datelor obținute *in vitro*, iar pentru îndeplinirea acestui obiectiv, am procedat la studiul *in vivo* pe animale de laborator.

În concluzie, studiile noastre s-au axat pe elucidarea potențialului de adeziune, proliferare și/sau a mecanismelor apărute în urma expunerii MSCs/EPCs la tratamentul cu E2, tratament ulterior ce poate spori capacitatea celulelor stem de a repara/regenera țesutul cardiac lezat.

Concluzii generale obținute în cadrul prezentei teze de doctorat

1. Celulele umane (folosite în studiile noastre) supuse stimulării cu E2 ar putea constitui un instrument util în tratarea leziunilor cardiace, în special la femei.

2. Utilizarea celulelor stem provenite din sângele de cordon ombilical și gelatina Wharton tratate cu estradiol poate fi o alternativă utilă pentru depășirea limitărilor terapeutice pentru tratarea leziunilor cardiace la femei.

3. Accesul facil și cultivarea MSCs sau EPCs din sursele alese în studiile noastre ocolește problemele etice cu care se confruntă celulele stem embrionare.

4. Infuzarea celulelor tratate cu estradiol pentru o scurtă durată (48 ore) ar limita riscul de carcinogeneză asociată estrogenului și ar permite tratarea leziunilor cardiace.

5. Mecanismele celulare, biologice și moleculare identificate în celulele umane tratate cu estradiol utilizând screening-ul proteomic, pot oferi noi perspective în înțelegerea și dezvoltarea strategiilor de optimizare a tratamentului miocardului lezat, mai ales la femei.

6. Boala cardiovasculară crește în cazul femeilor aflate la menopauză, perioadă caracterizată prin scăderea nivelului de estrogeni. Deoarece subiecții din acest grup au o mare probabilitate de a suferi boli de inimă pentru care necesita tratament, stimularea celulelor izolate din surse fetale cu estrogen, precum și pre-tratamentul subiecților de sex feminin, ar putea favoriza grefarea celulelor, rezultând o refacere eficientă a funcției cardiace.

7. Elaborarea unui sistem *in vitro* original, **brevetat** de noi și aplicat celulelor endoteliale progenitoare supuse tratamentului cu hormonul sexual E2, care demonstrează în timp real migrarea și interacțiunea celulă-celulă (tehnica de "scratch/wound healling"), proces modulat de prezența antagonistului de moleculă.

Bibliografie

1. Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, et al. Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis*. *Env Heal Perspect.* 1998;1(1):6-11. doi:10.1289/ehp.98106s111

2. Almeida M, Laurent MR, Dubois V, et al. Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*. 2017;97(1):135-187. doi:10.1152/physrev.00033.2015

3. Burns KA, Korach KS. Estrogen receptors and human disease: an update. *Arch Toxicol.* 2012;86(10):1491-1504. doi:10.1007/s00204-012-0868-5

4. Dubey RK, Jackson EK, Gillespie DG, Zacharia LC, Imthurn B, Keller PJ. Clinically used estrogens differentially inhibit human aortic smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(4):964-972. doi:10.1161/01.ATV.20.4.964

5. Turgeon JL, Carr MC, Maki PM, Mendelsohn ME, Wise PM. Complex Actions of Sex Steroids in Adipose Tissue, the Cardiovascular System, and Brain: Insights from Basic Science and Clinical Studies. *Endocr Rev*. 2006;27(6):575-605. doi:10.1210/er.2005-0020

6. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(12):5925-5930. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8650195. Accessed October 1, 2018.

7. Manson JE, Chlebowski RT, Stefanick ML, et al. Menopausal Hormone Therapy and Health Outcomes During the Intervention and Extended Poststopping Phases of the Women's Health Initiative Randomized Trials. *JAMA*. 2013;310(13):1353. doi:10.1001/jama.2013.278040

8. Manson JE, Hsia J, Johnson KC, et al. Estrogen plus Progestin and the Risk of Coronary Heart Disease. *N Engl J Med*. 2003;349(6):523-534. doi:10.1056/NEJMoa030808

9. Corotchi MC, Popa MA, Simionescu M. Testosterone stimulates proliferation and preserves stemness of human adult mesenchymal stem cells and endothelial progenitor

cells. *Rom J Morphol Embryol*. 2016;57(1):75-80. doi:10.1093/bioinformatics/btl627

10. Müller-Ehmsen J, Krausgrill B, Burst V, et al. Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41(5):876-884. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.07.023

11. Hou D, Youssef EA-S, Brinton TJ, et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation*. 2005;112(9 Suppl):I150-6. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.526749

12. Ray R, Novotny N, Crisostomo PR, Lahm T, Abarbanell A, Meldrum DR. Sex steroids and stem cell function. *Mol Med*. 2008;14(7-8):1. doi:10.2119/2008-00004.Ray

13. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-967. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9020076. Accessed November 26, 2018.

14. Ghen MJ, Roshan R, Roshan RO, et al. *Potential Clinical Applications Using Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord Blood*. Vol 13.; 2006. doi:10.1016/S1472-6483(10)60646-3

15. Brown MA, Zhang L, Levering VW, et al. Human umbilical cord blood-derived endothelial cells reendothelialize vein grafts and prevent thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(11):2150-2155. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207076

16. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104(9):2752-2760. doi:10.1182/blood-2004-04-1396

17. Zammaretti P, Zisch AH. Adult 'endothelial progenitor cells.' *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(3):493-503. doi:10.1016/j.biocel.2004.06.018

18. Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, et al. Endothelial Progenitor Cell Capture by Stents Coated With Antibody Against CD34. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(10):1574-1579. doi:10.1016/j.jacc.2005.01.048

19. Wassmann S, Werner N, Czech T, Nickenig G. Improvement of Endothelial Function by Systemic Transfusion of Vascular Progenitor Cells. *Circ Res*. 2006;99(8):e74-83.

doi:10.1161/01.RES.0000246095.90247.d4

20. Asahara T, Bauters C, Pastore C, et al. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation*. 1995;91(11):2793-2801. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7758186. Accessed November 26, 2018.

21. Stice JP, Lee JS, Pechenino AS, Knowlton AA. Estrogen, aging and the cardiovascular system. *Future Cardiol*. 2009;5(1):93-103. doi:10.2217/14796678.5.1.93

22. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity. *J Hypertens*. 2005;23(9):1699-1706. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16093915. Accessed November 26, 2018.

23. Li J, Peng X, Zeng X, et al. Estrogen Secreted by Mesenchymal Stem Cells Necessarily Determines Their Feasibility of Therapeutical Application. *Sci Rep*. 2015;5:15286. doi:10.1038/srep15286

24. Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, et al. Estrogen-related receptor γ Modulates cell proliferation and estrogen signaling in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;123(1-2):1-7. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.09.002

25. Baruscotti I, Barchiesi F, Jackson EEK, et al. Estradiol Stimulates Capillary Formation by Human Endothelial Progenitor Cells Role of Estrogen Receptor-α/β, Heme Oxygenase 1, and Tyrosine Kinase. …. 2010;56(3):397-404. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.153262.Estradiol

26. Cai JJ, Wen J, Jiang WH, Lin J, Hong Y, Zhu YS. Androgen actions on endothelium functions and cardiovascular diseases. *J Geriatr Cardiol*. 2016;13(2). doi:10.11909/j.issn.1671-5411.2016.02.003

Nr inregistrare Contractor IBPCNS 199/30.03.2021

Nr inregistrare UPB (P1) 5378/30.03.2021

Nr inregistrare INCDFM (P2) 730/30.03.2021

Nr inregistrare ICMPP (P3) 1383/30.03.2021

Program comun de CDI corelat cu planul de dezvoltare institutionala al fiecarui parteneriat din cadrul proiectului complex

TERAPII INTELIGENTE PENTRU BOLI NON-COMUNICABILE, BAZATE PE ELIBERAREA CONTROLATA DE COMPUSI FARMACOLOGICI DIN CELULE INCAPSULATE DUPA MANIPULARE GENETICA SAU BIONANOPARTICULE VECTORIZATE (INTERA; PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697)

Încheiat astăzi 29.03.2021 între:

- **Institutul de Biologie si Patologie Celulara „Nicolae Simionescu”** (IBPCNS), cu sediul în București, Strada B.P. Hasdeu nr. 8, tel: 40213194518, fax: 40213194519 e-mail: maya.simionescu@icbp.ro , cod fiscal 4364268, reprezentat prin DIRECTOR Acad. Maya Simionescu,

- **Universitatea Politehnica din București** (UPB), Centrul Național de Micro și Nanomateriale, cu sediul în București, Splaiul Independenței 313, tel: 40213171001, fax: 40213171002, e-mail: cabinet.rector@upb.ro , cod fiscal 4183199, reprezentată prin RECTOR Mihnea Costoiu,

- **Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizica Materialelor** (INCDFM) Bucureşti, cu sediul în Str. Atomiştilor, nr. 405A, Măgurele, judeţul Ilfov, Romania, tel.: 021369.01.85, fax: 021369.01.77, e-mail: director@infim.ro, înregistrată la Registrul Comerţului sub nr. J23/553/2002, cod fiscal RO9068280, reprezentat prin DIRECTOR GENERAL Dr. Ionuț-Marius Enculescu,

- **Institutul de Chimie Macromoleculara “Petru Poni”** (ICMPP), cu sediul în Aleea Grigore Ghica Voda 41A, Cod 700487, Iași, tel: 0232217454, fax: 0232211299, e-mail: office@icmpp.ro , cod fiscal 4541750, reprezentata prin DIRECTOR Dr. Valeria Harabagiu.

I. Premize

Bolile non-comunicabile (ateroscleroza, diabet, obezitate, cancer) reprezintă una din cauzele majore de mortalitate in lume, inclusiv in tara noastra. Componenta comună a acestor maladii este inflamația. Proiectul INTERA a urmărit stabilirea unor metode terapeutice inovative care, prin reducerea procesul inflamator să amelioreze procesele patologice. INTERA a inclus studii multi- si transdisciplinare pentru crearea si definirea unor noi nano- sau micro-dispozitive medicale utilizabile pentru terapii anti-inflamatoare inteligente si inovatoare. INTERA a inclus patru proiecte:

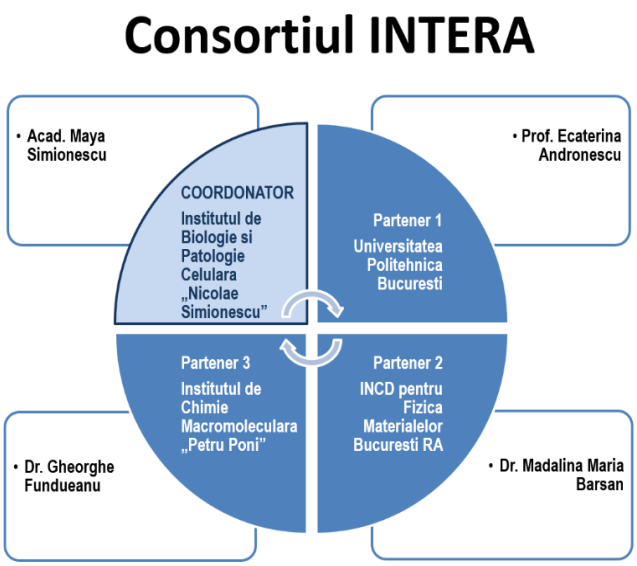
(1) Încapsularea celulelor eucariote manipulate genetic pentru eliberarea controlată a unor produși farmacologici activi;

(2) Conceperea unei platforme 3D compusa din celule incorporate in bio-matrici tridimensionale pentru testare pre-clinica de medicamente;

(3) Nanobioparticule inteligente concepute pentru vectorizarea compușilor bioactivi către situsuri patologice pentru terapia inflamației vasculare;

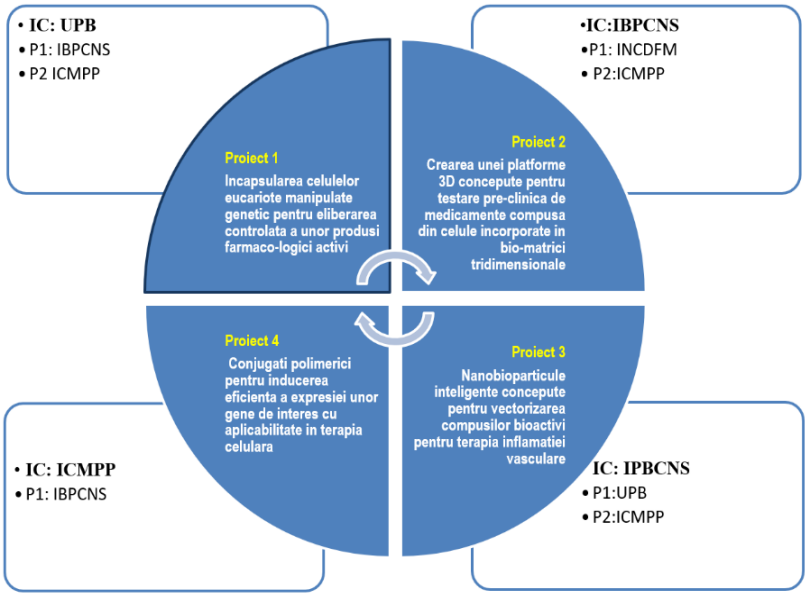
(4) Conjugati polimerici pentru inducerea eficienta a expresiei unor gene de interes cu aplicabilitate in terapia celulara.

Consorțiul INTERA este format din 4 unități de cercetare partenere – doua institute ale Academiei Romane (IBPCNS, ICMPP), o universitate (UPB) si un institut national de CD (INCDFM) cu o buna acoperire teritoriala (București-Ilfov-Iași). Partenerii cu profil de specializare similar (UPB, INCDFM, ICMPP) sau complementar (IBPCNS / UPB, INCDFM, ICMPP) asigura utilizarea unor tehnologii multidisciplinare permițând realizarea unor produse inovative micro-/nano-terapeutice si dezvoltarea de tehnologii nano-farmaceutice. Toate instituțiile partenere au realizat infrastructuri de cercetare noi prin fondurile structurale. Prin implementarea INTERA, fiecare instituție si-a dezvoltat si mai puternic capacitățile proprii.



Agenda comuna

Proiectele componente INTERA



Proiectele din cadrul INTERA sunt proiecte de interes actual si de viitor, fiind la intersecția unor domenii de cercetare abordate de instituțiile partenere.

Aceste strategii de cercetare sunt incluse in programele de cercetare ale instituțiilor partenere, urmărind dezvoltarea de studii multi- si transdisciplinare care doar împreuna pot crea si defini noi nano- sau micro-dispozitive medicale utilizabile pentru terapii anti-inflamatoare inteligente si inovatoare.

Dezvoltarea unor noi competente, dar si îmbunătățirea celor existente in unitățile partenere va atrage atenția mediului economic, spre o mai buna corelare a intereselor științifice cu cele economice, dar si o mai buna valorizare in domeniul științei medicamentelor, prin oferirea rezultatelor cercetării mediului economic (companii farmaceutice sau micro-întreprinderi cu profil biotehnologic). Din punct de vedere social, dezvoltarea instituționala in domeniul de cercetare deschis de proiectul INTERA va conduce la noi abordări terapeutice, mult mai accesibile populației datorita unui cost mai scăzut, având implicații majore in îmbunătățirea calității vieții.

Concret, la baza programului comun de CDI stau rezultatelor obținute prin implementarea proiectului INTERA si dezvoltarea capacitații instituționale a partenerilor: Pe baza rezultatelor obtinute pana acum, ne propunem sa continuam si extinde colaborarea noastra, avand o serie de obiective dintre care unele sunt enumerate mai jos.

1. Consolidarea si extinderea competentelor științifice si tehnice. Instituțiile participante la INTERA au un profil științific complementar. Astfel fiecare instituție a putut dezvolta noi tehnologii care îmbina diferite ramuri științifice, importând anumite tehnologii de la unitățile partenere. In același timp, instituțiile cu profil similar au beneficiat de

schimburi de experiența si de competenta, astfel încât si-au putut îmbunătăți reciproc activitățile științifice si tehnice. Implementarea proiectului a condus la creșterea competențelor de cercetare în domeniul Nanomedicinei și Biomaterialelor a instituțiilor partenere și la creșterea vizibilității pe plan internațional prin publicarea rezultatelor comune în reviste cotate ISI. Acest fapt va avea drept consecință in continuare atragerea resursei umane și creșterea colaborărilor cu alte grupuri de cercetare din țară și din străinătate.

2. Creșterea numărului de tineri implicați in cercetare si specializarea acestora. Cele 10 noi locuri de munca in cercetare si pregătirea tinerilor pentru cercetare reprezintă un beneficiu al instituțiilor participante in proiectul INTERA, suplinind o parte din deficitul de personal si asigurând buna funcționare a infrastructurilor de cercetare create anterior. Proiectul INTERA a constituit o platformă pentru instruirea și calificarea tinerilor nou angajați care au beneficiat de transferul de cunoștințe de la cercetătorii cu experiență. Au fost cooptați cercetători din afara proiectului care fac parte din alte instituții, cum ar fi UMF Iași, in realizarea unor teme specifice, crescând interesul pentru subiectele dezvoltate in cadrul proiectului INTERA ceea ce a facilitat oportunități comune de dezvoltare a unor noi proiecte de cercetare. Astfel, preconizăm creșterea capacității de cercetare a echipelor din instituțiile partenere, dezvoltarea de arii noi de cercetare bazate pe noi abordări bio-nano-tehnologice și intensificarea competitivității și vizibilității cercetării din România.

3. Creșterea numărului de produsele tehnologice, serviciile noi sau îmbunătățite, cererile de brevet, prezentări la saloanele de inventica, lucrările publicate. Rezultatele emergente din proiectul INTERA stau la baza unei interactii mult mai eficiente cu mediul economic. Ofertele de servicii noi de cercetare si tehnologice au fost postate in platforma ERRIS, pentru o mai buna vizibilitate. Participarea la Saloane Naționale și Internaționale de inventică cu brevetele rezultate în cadrul proiectului INTERA a dus la recunoașterea valorii acestor brevete prin acordarea a numeroase premii și a explorat interesul pentru a dezvolta produsele și tehnologiile patentate. Valorificarea si difuzarea rezultatelor de cercetare precum si acordarea de asistenta de servicii științifice si tehnologice în domeniul prioritar Bioeconomie vor sta la baza colaborării unităților partenere. Fezabilitatea parteneriatului este asigurata de experiența cercetătorilor, de existenta resurselor materiale si de datele experimentale acumulate ale participanților.

4. Utilizarea eficienta a infrastructurii din instituțiile partenere. Instituțiile partenere INTERA vor beneficia in continuare de infrastructurile îmbunătățite ale consorțiului, folosindu-se potențialul material al partenerilor pentru a asigura Programul Comun de cercetare dezvoltare si inovare (CDI). Infrastructura existenta in cadrul instituțiilor partenere si a celor noi cooptate permite continuarea cercetărilor aplicative axate pe produșii proiectați si sintetizați in cadrul proiectului INTERA, permițând si testarea *in vitro* si *in vivo*, dar si dezvoltarea unor aplicații diferite de cele preconizate care pot fi sursele unor noi idei de cercetare-dezvoltare.

Infrastructurile sunt evidențiate pe site-ul ERRIS astfel:

- Institutul de Biologie si Patologie Celulara „Nicolae Simionescu” https://eeris.eu/ERIO-2000-000Z-0136

- Universitatea Politehnica din București - UPB, https://eeris.eu/ERIF-2000-000H-0593

- Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizica Materialelor – INCDFM https://eeris.eu/ERIO-2000-000Y-0145

- Institutul de Chimie Macromoleculara “Petru Poni”, https://eeris.eu/ERIO-2000-000V-0034

II. Stadiul curent al colaborării si modalități de continuare si extindere

Pe lângă proiectul INTERA, cercetătorii din instituțiile din acest consorțiu au mai participat impreuna la alte proiecte de cercetare cum sunt:

- *Apolipoproteine generate prin inginerie genetica imobilizate pe nanoparticule - un cal troian molecular pentru țintirea plăcii aterosclerotice,* proiect PN-II-RU-TE-2014-4;

- *Evaluarea potențialului terapeutic al transferului genic non-viral al apolipoproteinei E pentru limitarea progresiei aterosclerozei*, proiect PN-III-P1-1.1-PD-2016-1942;

- *Biologically Inspired Systems for Engineered Structural and Functional Entities,* proiect PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028 (http://www.intelcentru.ro/Biomimetics_PCCE/);

- *Mimarea mecanismelor viului prin abordări ale chimiei supramoleculare, in cinci dimensiuni,* proiect PN-III-ID-PCCF-2016.

- *Măsurarea in timp real a efectului fasciculului de protoni indus de laser asupra celulelor umane:* PN-III-P5/Subprogramul 5.1/ELI-RO; 189/18.10.2017 (2017-2019)

Bazele unor astfel de cercetări multidisciplinare in colaborare, constituie etapele premergătoare unor proiecte mai mari. Toate aceste acțiuni vor conduce la acumularea unor noi cunoștințe ale personalului implicat, prin relații de colaborare cu cercetători din domenii conexe, cum ar fi medicina, biologie si fizica. Aceste activități stau la baza continuării si extinderii colaborărilor dintre parteneri si vor conduce inerent la depunerea unor noi proiecte de cercetare științifică, necesare pentru finanțarea transferului tehnologic a rezultatelor cercetării fundamentale.

Oportunitățile de finanțare in acesta perioada in Romania sunt limitate, însă vom încerca sa obținem atât finanțări naționale cat si finanțări europene sau din alte surse. Consorțiul își propune sa aplice in apeluri pentru proiecte de cercetare naționale si internaționale. Consorțiul va beneficia de strategia de abordare a surselor de finanțare a ICMPP, care cuprinde: dezvoltare a capacității organizatorice si manageriale a activității de cercetare: STREAM, dezvoltarea infrastructurii de cercetare INTEl Centru si dezvoltarea resursei umane: Fondul Social European - Program de burse postdoctorale Cristofor I. Simionescu .

De asemenea, o atenție deosebita este acordata CLUSTERILOR. Astfel, in acest moment atât ICBPNS cat si UPB sunt membrii ai clusterului **AngioNET,** însă in viitorul apropiat si ceilalți parteneri vor adera la acest cluster care urmărește să genereze și să aplice inițiative și activități legate de sănătate și mediu, sa promoveze și încurajeze inovarea prin cooperarea între companii, organizații, universități, entități publice și transferul cunoștințelor în vederea creșterii calității serviciilor medicale în domeniul bolilor cardiovasculare și oncologice în România.

III. Domenii de dezvoltare ale planului comun CDI

Domeniul Sănătății este considerat un domeniu de cercetare prioritar, fiind încadrat in Programul Horizon Europe 2021- 2027/ Pilonul 2 Provocări globale si competitivitate industriala europeana si in Strategia Națională de Sănătate 2014 – 2020. Cercetarea actuala in domeniul biomedical se poate obține numai prin colaborări reale, prin multi- si transdisciplinaritate si convergenta activităților CDI.

Așa cum a fost asumat in propunerea de proiect, pe baza expertizei realizate in cadrul derulării proiectului INTERA, a fost conturat un program comun de dezvoltare sustenabila a activităților CDI pentru perioada post-implementare a proiectului, in vederea continuării colaborărilor dintre echipele partenere, după finalizarea proiectului. Aceasta continuare a activităților științifice se va realiza prin proiecte de cercetare comune cu care se va participa la competiții de granturi naționale si internaționale.

Datorită complexității obiectivelor de cercetare este necesară colaborarea unor echipe de cercetare cu competente interdisciplinare și accesul la infrastructura de cercetare existentă în instituțiile partenere. In acest sens, cooperarea instituționala este un instrument esențial in activitatea de cercetare, implicând menținerea colaborărilor deja stabilite între echipele de cercetare din instituțiile partenere pentru o realizare cât mai eficientă a obiectivelor de cercetare ale fiecărei instituții în parte. Majoritatea activităților științifice propuse va implica consorțiul existent (integral sau parțial) însă extinderea consorțiului va permite o specializare suplimentară și implicit optimizarea avansată a soluțiilor propuse. Obiectivul major este consolidarea unui nucleu cu competențe științifice si tehnologice în domeniul nanoparticulelor cu potențial de direcționare, a vectorilor non-virali și a materialelor avansate ce răspund la nevoile nanomedicinii în tratamentul bolilor non-comunicabile (de ex. boli cardiovasculare, respiratorii, cancer). De asemenea, se are in vedere diversificarea gamei de servicii de cercetare și transferul acestora către partenerii industriali, în scopul stimulării competitivității cercetării științifice românești la nivel european și a competitivității economice naționale ale institutelor de cercetare implicate în domeniul de specializare inteligentă.

Majoritatea activităților științifice propuse vor implica consorțiul existent (integral sau parțial) dar gândim si la extinderea consorțiului care va permite o specializare suplimentară și implicit optimizarea avansată a soluțiilor propuse.

Obiective specifice previzionate pentru **colaborări viitoare**:

- **Realizarea unor cercetări științifice avansate, asigurată de complementaritatea consorțiului** atât din punct de vedere al resursei umane cât și a infrastructurii de cercetare;

- **Creșterea competitivității cercetării românești** la nivel național și internațional, prin crearea unui nucleu de cercetare cu competență științifică și tehnologică de nivel înalt, prin colaborare inter-instituțională cu competente științifice si infrastructura conexe

- **O mai buna valorificare a rezultatelor cercetării** prin introducerea acestora în circuitul economic sub formă de produse, procese și servicii noi. Stimularea transferului tehnologic prin crearea de parteneriate cu IMM-uri.

- **Creșterea vizibilității internaționale** și a implicării nucleului de cercetare nou creat în proiecte europene.

- **Creșterea calității resursei umane** prin i**nstruirea și calificarea tinerilor in domeniul cercetării biomedicale,** prin schimburi de experiența si prin dezvoltarea de teze de doctorat în cotutelă;

- **Susținerea reciprocă a tinerilor cercetători postdoctoranzi** (beneficiari ai unor proiecte PD) în vederea realizării proiectelor;

- **Crearea de noi locuri de muncă** și asigurarea condițiilor optime de desfășurare a activităților CDI

- **Aderarea comuna la clusteri pentru a extinde expertiza**, accesul la infrastructura de cercetare specifica si creșterea vizibilității naționale si internaționale in vederea accesului la finanțările națională si internaționale

- **Organizarea și participarea la evenimente științifice**, precum workshop-uri si cursuri postuniversitare.

Activitatea de cercetare va continua pe tematicile proiectului INTERA, însă se vor aborda si teme emergente sau noi. Prezentul program comun de CDI, corelat cu planurile de dezvoltare instituțională ale partenerilor INTERA este in concordanta cu Propunerea Comisiei Europene privind Horizon Europe 2021 - 2027 si cu Strategia Națională pentru Dezvoltare Durabila a României 2030.

Direcțiile principale de cercetare vor fi:

1. Materiale polimerice avansate cu aplicații biomedicale

Dezvoltarea științei polimerilor si versatilitatea acestora a dus la o larga utilizare in domeniul biomedical si biotehnologic atât al polimerilor naturali cât si a celor sintetici. Combinarea proprietăților polimerilor naturali cu cele ale polimerilor sintetici a dus la obținerea unor materiale cu caracteristici superioare. Aceste materiale polimerice vor fi transformate in matrici hibride multicomponente, retele semi- sau inter-penetrate, polimeri grefați, bloc copo-

limeri, polimeri sensibili la stimuli externi, polimeri cu amfifilie variabilă, polimeri cu amprenta moleculara, polimeri biomimetici. Biomateriale avansate cu proprietăți fizico-chimice si biologice controlate se vor utiliza sub forma de suporturi macromoleculare (micro- si nanoparticule/capsule) pentru reținerea si eliberarea controlata de medicamente, pentru trimiterea dirijata "la ținta" a medicamentelor /ADN, suporturi "inteligente" pentru eliberarea cu autoreglare a principiilor active, hidrogeluri biomimetice pentru ingineria (regenerarea) diferitelor tesuturi (osos, muscular, epitelial, etc).

Obiectivele specifice ale acestor cercetări sunt:

- conceperea si dezvoltarea unor surogate de țesuturi normale si tumorale prin creșterea de celule pe suporturi macromoleculare cu porozitate controlata. Aceste țesuturi surogat pot ajuta la măsurarea *in vitro* a eficientei unui medicament in timpul stadiilor preclinice de dezvoltare a medicamentului sau pot sa fie utilizate pentru studierea pato-biologiei tumorilor (*in vitro*) prin monitorizarea proliferării celulelor canceroase, invaziei, remodelarea matricilor, angiogenezei sau metastazelor.

- obținerea de polimeri sintetici si naturali modificați chimic, cu arhitecturi complexe (hidrogeluri, filme, micro- si nano-particule/capsule) pentru eliberarea controlata a medicamentelor, pentru trimiterea dirijata "la ținta" a medicamentelor (ADN), ca suporturi biomimetice pentru ingineria (regenerarea) diferitelor țesuturi (osos, muscular, epitelial, etc.) sau pentru înglobarea/creșterea de celule.

- dezvoltarea de tuburi pe bază de alginat (sau alți polimeri) pentru aplicații cardiovasculare atât ca sistem suport pentru regenerare cât și ca sistem cu eliberare controlată pentru tratamente multiple;

- ranforsarea matricilor de alginat cu nanoparticule magnetice funcționalizate și exploatarea sinergismului dintre acestea.

- utilizarea oxidului de grafenă în formă pură cât și în compozite complexe cu potențial regenerativ și medicamentos.

- perfecționarea tehnologiei de obținere a fibrelor electrofilate pentru realizarea de plase electrofilate din diverși polimeri biocompatibili. De asemenea, se vor perfecționa procedeele de electrofilare având ca precursori coplomeri biocompatibili, in vederea obținerii de plase electrofilate de o robustețe si elasticitate sporite. Platformele 3D flexibile obținute vor fi funcționalizate cu diverse metale si/sau polimeri conductori care astfel vor avea un rol dual: i) suport pentru incorporarea de celule si ii) senzor electrochimic. Plasele electrofilate metalizate si populate cu celule vor permite efectuarea in-situ de măsurători electrochimice ale răspunsului celulelor vasculare in diverse biomatrici tri-dimensionale. Se vor dezvolta senzori electrochimici care sa fie suport pentru diverse tipuri celulare, si care vor putea monitoriza procese metabolice celulare prin detectarea unor metaboliți intracelulari ca de exemplu adenozin trifosfat, nicotinamidă-adenină dinucleotidă, dar și oxigen, superoxid, dioxid de carbon sau glucoză.

2. Sisteme de livrare de agenți terapeutici bazate pe nanoparticule

Cercetarea in acest domeniu se concentrează pe dezvoltarea unor terapii avansate bazate pe nanotehnologie pentru atenuarea bolilor cardiovasculare.

Obiectivele specifice ale acestor cercetări sunt:

- Dezvoltarea de nanoterapii direcționate către endoteliul vascular și monocite/macrofage pentru a reduce inflamația vasculară folosind modele experimentale pre-clinice de inflamație și ateroscleroză. Se are în vedere obținerea de nanocărăuși capabili de transport dirijat și livrarea eficientă la țintă a agenților farmaceutici sau de secvențe de siRNA/shRNA pentru silențierea genică;

- Testarea nanocărăușilor biomimetici structurali și funcționali și a nanoplatformelor capabile să acționeze ca vehicule de transfecție genetică;

- Dezvoltarea de platforme magnetice cu potențial în tratamentul unor boli cardiovasculare;

- Exploatarea nanocărăușilor magnetici în vederea dezvoltării de sisteme cu eliberare controlată, cu internalizare superioară în celule și eliberare țintită declanșată electromagnetic pentru diversele substanțe biologic active;

- Sortarea nanoparticulelor (conform cererii de brevet comune) și utilizarea nanoparticulelor cu caracteristici predefinite pentru aplicații țintite;

- Utilizarea nanoparticulelor cu miez de oxid metalic in abordarea teranostica a terapiei cancerului, prin care nanoparticulele pot fi agenți de livrare a unor medicamente antitumorale, factori de scăderea a stresului oxidativ si agenți de contrast.

IV. Rezultatele preconizate ale colaborării

I.**Stimularea capacității de inovare prin abordarea unor teme cu grad de complexitate crescut.** Realizarea unor proiecte multidisciplinare in domeniul biomedical, cu rezultate concrete si cu un grad mare de aplicabilitate.

II.**Corelarea si coordonarea activităților si resurselor pentru o mai buna valorificare a rezultatelor la nivel economic si social.** Valorificarea potențialului de cercetare pentru realizarea proiectelor complexe, multidisciplinare, de înalta dificultate. Proiectele emergente ale partenerilor consorțiului vor asigura realizarea unor dispozitive terapeutice inovative, cu un real impact social asupra îmbunătățirii sănătății si, ca urmare, a creșterii nivelului de trai.

III.**Creșterea competitivității si vizibilității instituțiilor partenere la nivel internațional,** care sa faciliteze cooptarea in consorții si clustere naționale si internaționale;

IV.Dezvoltarea unor noi proiecte care sa conducă la **crearea unor noi locuri de munca si continuarea activității de formare a tinerilor cercetători** prin accesarea de fonduri din programe de cercetare naționale si europene;

V.Realizarea unor competentele noi, abilitățile practice si experiența in cercetare acumulate vor contribui la consolidarea si **extinderea capacităților instituționale.** Aceasta va crea condiții pentru accesare si obținere de resurse financiare alternative si complementare de sprijinire a activității de cercetare;

VI.**Accesul la infrastructura din instituțiile partenere si îmbunătățirea infrastructurii instituționale**;

VII.**O mai buna valorificare si difuzare a cunoștințelor, competentelor si rezultatelor cercetărilor**. Creșterea capacitații de diseminare si dezvoltarea abilitaților de comunicare ale cercetătorilor va aduce beneficii directe comunității științifice academice din domeniul farmacologiei celulare si moleculare si clinicienilor care vor putea prelua rezultatele noastre si folosi ca metoda concept pentru alte tratamente inovative. O categorie importanta de beneficiari direcți o reprezintă companiile si firmele medicale (in special mici si mijlocii), laboratoarele de cercetare biomedicala naționale sau internaționale cu care deja cooperam sau intenționam sa colaboram. Prin schimburi de idei si colaborări intre comunitățile științifice si economice, rezultatele vor putea fi transferate din mediul științific in practica medicala si industriala. Pe plan socio-economic, in viitor, beneficiarii direcți vor fi pacienții cu maladii grave in care procesul inflamator este predominant. Pentru acești pacienți, nanoterapia si intervențiile folosind biomateriale ar putea reprezenta alternative non-invazive la terapiile invazive existente. In plus, costul social deosebit de mare al bolnavilor cu maladii cardiovasculare ar putea fi redus substantial.

VIII.Creșterea numărului de cereri de patente si o mai buna cunoaștere a nevoilor inovative, prin **inițierea si dezvoltarea de colaborări viabile cu parteneri din mediul economic si privat.** Dezvoltarea cercetărilor translaționale in instituțiile partenere si transferul rezultatelor cercetărilor către companii farmaceutice, in special IMM.

IX.**Creșterea gradului de implicare si vizibilitate pe plan internațional.** Articolele științifice publicate în reviste cotate WoS cu factor de impact reprezintă premizele majore pentru creșterea vizibilității cercetării românești. Ne propunem sa publicam rezultatele originale obținute de partenerii din proiect dar numai după brevetarea/ valorificării lor prin licențiere sau prin înființarea de firme spin-off/start-up sau participarea la saloane de inventica, naționale/ internaționale. Aceasta va asigura si dreptul la proprietate intelectuala si vizibilitatea rezultatelor cercetării romanești la nivel internațional.

X.**Creșterea capacitații de acordare de asistenta tehnica si de servicii tehnico - științifice de înalt nivel in domeniul prioritar Bioeconomie.** Vor putea fi oferite altor unități din domeniu noi servicii științifice si tehnologice de înalt nivel, datorita noilor tehnologii implementate de către consorțiul INTERA. Introducerea unor noi tehnologii in instituțiile partenere va conduce la specializarea echipelor in aceste tehnici si la asigurarea noilor servicii oferite altor cercetători din tara, care vor fi afișate pe site-ul ERRIS.

RAPORT STIINTIFIC FINAL

Denumirea proiectului: Imbunatatirea proprietatilor paracrine ale fibroblastelor prin agregare tridimensională pentru terapia ranilor cronice

Cod proiect: PN-III-P1-1.1-TE-2021-1344

Numar contract: 149/2022

Perioada de raportare: 9.06.2022 – 7.09.2024

Scopul acestui proiect a fost de a determina daca fibroblastele pot fi o sursa alternativa in terapia de regenerare fara celule, prin imbunatatirea prorietatilor lor paracrine prin declansarea nemozei indusa in cultura tridimensionala. Pentru a atinge acest scop, am avut mai multe obiective: (1) evaluarea proprietatilor secretomului recoltat de la sferoizii derivati din fibroblaste asupra procesului de vindecare a ranilor in vitro, (2) evaluarea modificarii proprietatilor pro-angiogene induse de procesul de agregare a fibroblastelor, (3) evaluarea proprietatilor anti-inflamatorii induse de procesul de agregare si (4) validarea efectelor observate pe model murin de rani excizionale. Un obiectiv aparte l-a constituit Managementul si Diseminarea rezultatelor proiectului.

Proiectul s-a desfasurat in 3 mari etape:

Etapa 1: Evaluarea in vitro a proprietatilor de vindecare a ranilor a secretomului recoltat de la sferoizi derivati din fibroblaste;

Etapa 2: Determinarea proprietatilor pro-angiogene si anti-inflamatoare induse in fibroblaste de procesul de agregare;

Etapa 3: Validarea efectelor benefice in vindecarea ranilor a secretomului recoltat de la sferoizi derivati din fibroblaste pe model animal de rana excizionala.

In urma analizei rezultatelor obtinute in proiect, s-au demonstrat urmatoarele:

In prima etapa a fost selectat secretomul recoltat de la fibroblaste crescute in sferoizi derivati din 25.000 de celule, care a prezentat un potential crescut de a contribui la vindecarea ranilor cutanate, prin sustinerea urmatoarelor procese celulare: inducerea proliferarii si a migrarii keratinocitelor si a fibroblastelor dermale umane, inducerea formarii matricei extracelulare prin stimularea sintezei unor proteine componente ale acesteia precum colagenul de tip I si biglicanul, si prin inhibarea expresiei genice a metaloproteinazelor matriceale si prin stimularea chemoatractiei keratinocitelor.

In cadrul celei de-a doua etape, s-a demonstrat ca sistemul de cultura tridimensionala a indus modificari in compozitia secretomului fibroblastelor dermale, rezultatele in vitro aratand o imbunatatire a capacitatii fibroblastelor dermale umane de a sustine vindecarea ranilor cutanate, accelerand procesul de re-epitelizare a ranii. Dintre rezultatele notabile obtinute in Etapa 2 mentionam:
- Prin agregare 3D a fost indusa/crescuta secretia unor factori pro-angiogeni, precum CXCL16, DPPIV, Endostatina, FGF7, HGF, IL-8, MCP-1, PIGF, Prolactina si VEGF. Consideram ca o

importanta deosebita o au: cresterea nivelului de VEGF si inducerea de novo a secretiei de IL-8, ambele fiind cunoscute molecule pro-angiogene.
- Rezultatele obtinute *in vitro*, dar si *in vivo* sugereaza ca modalitatile prin care mediul conditionat obtinut de la fibroblaste crescute in sistem 3D, dar si 2D, promoveaza procesul de angiogeneza, ,âsunt sustinerea migrarii celulare si chemoatractia. Inducerea maturarii vaselor de sange a fost sustinuta doar de modelul 3D;
- In modelul nostru experimental *in vitro* nu s-a observat o actiune pro sau anti-inflamatoare a mediului conditionat obtinut de la agregatele 3D, insa modificarile observate in profilul citokinelor inainte si dupa agregare sugereaza ca acesta ar putea avea un rol in modularea procesului inflamator, prin cocktailul de molecule cu rol atat de sustinere, cat si de inhibare a acestuia;
- A fost demonstrata implicarea procesului de nemoza in determinarea secretiei de citokine si factori de crestere a fibroblastelor crescute in sistem 3D.

In cadrul celei de-a treia etape, rezultatele obtinute in vitro au fost validate pe un model murin de rana excizionala, care a recapitulat fazele vindecarii pielii umane, inclusiv dezvoltarea unui tesut de granulatie, demonstrand ca poate fi folosit pentru o evaluare preclinica a unui posibil tratament.

Utilizand acest model, s-au observat urmatoarele:
- mediul conditionat obtinut de la fibroblaste crescute in sistem 3D a indus o inchidere a ranii mai rapida la 7 zile, comparativ cu controlul tratat cu DMEM si controlul mediul conditionat obtinut de la fibroblastele crescute in sistem 2D;
- S-a observat o maturare a vaselor de sange in cazul animalelor tratate cu mediul conditionat obtinut de la fibroblaste crescute in sistem 3D; acest lucru se coroboreaza cu rezultatele de evaluare a angiogenezei pe pat de Matrigel, raportat in etapa anterioara;
- S-a evidentiat o re-epitelizare mai rapida a tesutului lezat in cazul animalelor tratate cu mediul conditionat obtinut de la fibroblaste crescute in sistem 3D, acest rezultat fiind, de asemenea, in deplina concordanta cu rezultatele in vitro pe culturi de celule obtinute in etapele anterioare;
- S-a observat o remodelare mai rapida si mai intensa in cazul animalelor tratate cu mediul conditionat obtinut de la fibroblaste crescute in sistem 3D (Figura 1), sugerand o vindecare profunda a ranii mai rapida comparativ cu celelalte conditii, in concordanta cu rezultatele care aratau ca acest mediu induce o sinteza crescuta a colagenului de tip I in fibroblastele dermale cultivate in sistem clasic;

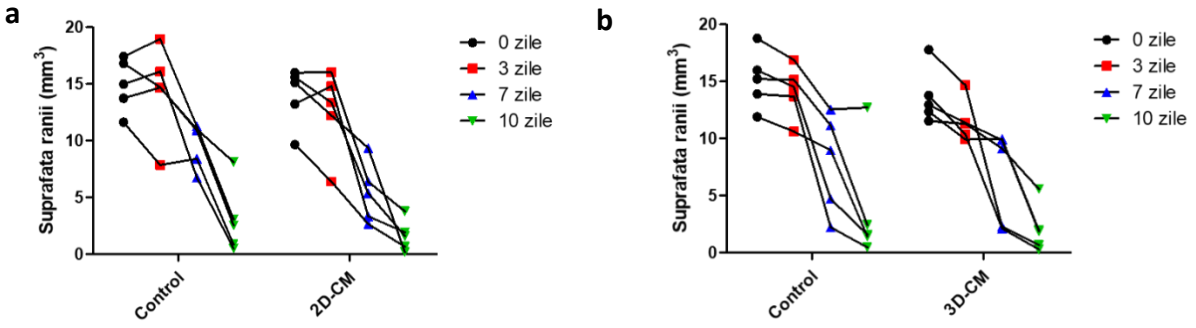


Figura 1. *Evolutia in timp a ranii pentru animalele tratate cu mediu conditionat recoltat de la fibroblaste crescute in sistem 2D, respctiv 3D.*

- Rezultatele sugereza un proces inflamator scazut la 7 zile la nivelul leziunii, in cazul animalelor tratate cu 3D-CM.

In **concluzie**, putem spune ca procesul de agregare a imbunatatit capacitatea fibroblastelor dermale umane de a sustine vindecarea ranilor cutanate intr-un model de rana pe model murin, accelerand procesul de re-epitelizare a ranii. Astfel, in cadrul acestui proiect, realizarea integrala a activitatilor propuse a dus la demonstrarea ipotezei, sustinand ideea ca fibroblastele ar putea constitui o sursa alternativa pentru terapia regenerativa fara celule, care utilizeaza produsii eliberati de acestea.

Diseminare

Articole ISI publicate/in curs de publicare (membrii echipei proiectului sunt subliniati):

1. Iacomi DM, Rosca AM, Tutuianu R, Neagu TP, Pruna V, Simionescu M, Titorencu I. Generation of an immortalized human adipose-derived mesenchymal stromal cell line suitable for wound healing therapy. Int J Mol Sci. 2022 Aug 10;23(16):8925. (IF = 6.208).
2. Tudoroiu EE, Albu Kaya MG, Titorencu I, Dinu-Pîrvu CE, Marin MM, Roșca AM, Popa L, Anuța V, Antoniac A, Chelaru C, Kaya DA, Prisada RM, Ghica MV. (2023) Design and evaluation of new wound dressings based on collagen-cellulose derivatives, Materials & Design, 236: 112469 (IF = 8.4)
3. Luca I, Albu Kaya MG, Titorencu I, Dinu-Pîrvu CE, Marin MM, Popa L, Roșca AM, Antoniac A, Anuța V, Ghica MV, Physico-chemical characterization and biocompatibility evaluation of some vaginal formulations based on collagen and mucoadhesive polymers, *in revizie.*

Articole ISI in preparare:

1. Dănilă E, Albu Kaya MG, Marin MM, Titorencu I, Rosca AM, Coman AE and Constantinescu RR. Extraction and characterization of fish collagen hydrogel from northern pike (Esox lucius) with potential application in skin wound healing– manuscris in preparare;
2. Ghetu (Iacomi) DM, Tutuianu R, Simionescu M, Titorencu I, Rosca AM. Three-dimensional organization of human dermal fibroblasts enhances their paracrine role in skin wound healing - manuscris in preparare;
3. Ghetu (Iacomi) DM, Tutuianu R, Simionescu M, Titorencu I, Rosca AM. The secretome of human dermal fibroblasts spheroids supports skin regeneration by promoting the remodeling of the extracellular matrix on a full thickness wound mouse model - manuscris in preparare.

Capitol de carte:

1. Rosca AM, Tutuianu R, Ghetu (Iacomi) DM, Titorencu I. (2023). Mesenchymal Stromal Cells for Wound Healing Therapy: From Expectations to Reality. In: Haider, K.H. (eds) Handbook of Stem Cell Applications. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-0846-2_53-1.

Postere:

1. Tutuianu R, Rosca AM, Ghetu (Iacomi) DM, Pruna V, Albu Kaya MG. „Evaluation of mesenchymal cells-derived products as therapeutics for skin regeneration". Poster prezentat la manifestatia stiintifica "1st NETSKINMODELS Network event" organizata la Bratislava, Slovacia, 14-18 februarie 2023.
2. Tutuianu R, Rosca AM, Ghetu (Iacomi) DM, Titorencu I, Rosca AM. Mediul conditionat derivat de la fibroblaste cultivate in sferoizi promoveaza regenerarea pielii pe un model murin de rana cutanata; Poster prezentat la manifestatia stiintifica Simpozionul ARSAL 2024 ,,Evaluarea severității și conceptul 3R in proiectele ce folosesc animale în experimentare", 29 martie 2024, organizat de Asociaţia Română pentru Ştiinţa Animalelor de Laborator, gazduita de Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale "Victor Babeș".

Prezentare orala:

Irina Titorencu. "MSC based therapy for diabetic chronic wounds". Prezentare in manifestatiei stiintifica "1st NETSKINMODELS Network event" organizata la Bratislava, Slovacia, 14-18 februarie 2023.

Crearea si mentinerea unei pagini web.

A fost realizata si actualizata pagina web a proiectului: http://www.icbp.ro/static/en/en-networking_grants-grants-national_grants/fibrother.html

Pagina web a acestui proiect a fost actualizata cu informatiile la zi si se va reveni la aceasta pe masura ce vor aparea alte rezultate obtinute ca urmare a desfasurarii acestui proiect, inclusiv dupa terminarea proiectului.

Director Proiect,
(*Nume, Prenume, Semnatura*)

Rosca Ana-Maria

The Romanian Academy
Institute of Cellular Biology and Pathology
„Nicolae Simionescu"

Ph.D. Thesis

Gene expression modulation of apolipoproteins with therapeutic potential in atherosclerosis

Thesis Summary

Supervisor:

Acad. Maya Simionescu

PhD. Student

Trușcă Georgeta Violeta

BUCHAREST
2013

TABLE OF CONTENTS

Part I

The current level of knowledge

Introduction 5

I. Lipoprotein metabolism in normal and pathological conditions 7

I. 1. Classification and composition of lipoprotein 7

I. 2. General characteristics of apolipoproteins 14

I. 3. Metabolism of chylomicrons, VLDL, LDL, IDL and HDL 19

I. 4. Involvement of lipoproteins in vascular pathology, atherosclerosis 22

I. 5. Efflux of cholesterol from cells, antiatherosclerotic process 26

II. Structural and functional characterization of apoE and apoCII 31

II. 1 Apolipoprotein E 31

II. 1. 1. Gene structure of apoE 32

II. 1. 2. Gene regulation of apoE 32

II. 1. 3. Protein structure of apoE 35

II. 1. 4. ApoE - Isoforms 36

II. 1. 5. Receptors of apoE 41

II. 1. 6. Benefits of apolipoprotein E under normal conditions and its role in the prevention and treatment of atheroscleros 44

II. 2. Apolipoprotein CII 49

II. 2. 1. Gene structure of apoCII 49

II. 2. 2. Gene regulation of apoCII 50

II. 2. 3. Protein structure of apoCII 51

II. 2. 4. Essential functions of apoCII 54

III. Regulation of gene expression 56

III. 1. Proximal and distal gene regulatory elements 56

III. 2. Mechanism of gene transcription initiation 58

III. 3. Transcription factors and nuclear receptors involved in the modulation of gene expression . 60

III. 3. 1. Factors involved in the differentiation of macrophages 61

III. 3. 2. The transcription factors from AP-1 complex 66

III. 3. 3. STAT transcription factors 77

III. 3. 4. C-Myb transcription factors 81

III. 3. 5. RXR nuclear receptors 83

Part II

Original contributions

IV. Materials and Methods 86
IV. 1. Cell Cultures …..... 86
IV. 2. Plasmids 87
IV. 2. 1. Plasmids containing regulatory elements of apoE 87
IV. 2. 2. Plasmids containing regulatory elements of apoCII 90
IV. 2. 3. Plasmids containing regulatory elements of apoCI and apoCIV 90
IV. 2. 4. Cloning of plasmids (+) ME.2-luc and (-)ME.2-luc 91
IV. 2. 5. Construction of plasmid generating shRNA for STAT1 inhibition 94
IV. 2. 6. Cloning of CMV promoter in pGL3 basic vector 97
IV. 2. 7. Cloning of CHOP in pCMV-Sport6 vector..... 99
IV. 3. Transient transfection 101
IV. 4. Determination of the enzymatic activity of luciferase and β-galactosidase 102
IV. 5. Determination of protein concentration 103
IV. 6. Precipitation of proteins bound to biotinylated DNA 103
IV. 7. Imunotransfer 106
IV. 8. 3C technique (chromosome conformational capture) 107
IV. 9. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) 108
IV. 10. Precipitation of recombinant proteins fused with GST 108
IV. 11. Co-immunoprecipitation 109
IV. 12. Inhibition of STAT1 gene expression 109
IV. 13. RT-PCR 110
IV. 14. Real Time PCR ……..... 111
IV. 15. Statistical analysis of results 113
V. Results and discussion 114
V. 1. Regulation of gene expression during differentiation of monocytes into macrophages 114
V. 1. 1. Modulation of apoE expression by PMA during monocyte differentiation 114
V. 1. 2. ApoE expression regulation through interaction between promoter and distal regulatory element, ME.2, specifically in macrophages..... 117
V. 1. 3. Determination of the interaction between apoE promoter and distal regulatory elements during differentiation of monocytes into macrophages 122

V. 1. 4. Identification of minimum apoE promoter fragment that can be activated by multienhancer 2 128
V. 1. 5. Identification of minimum ME.2 region responsible for transcriptional stimulation of apoE promoter 130
V. 1. 6. Effect of interaction between ME.2 and other promoters of apoE/apoCI/apoCIV/apoCII gene cluster in macrophages 132
V. 2. Transcription factors and nuclear receptors involved in apoE gene regulation 134
V. 2. 1. ApoE regulation by transcription factor PU.1 134
V. 2. 2. Modulation of apoE promoter activity by C/EBP factors 136
V. 2. 3. Modulation of apoE expression by AP-1 transcription factors 141
V. 2. 4. Indirect action of STAT1 on apoE promoter through ME.2 146
V. 2. 5. Inhibition of apoE expression by stress factors 155
V. 2. 6. Positive regulation of apoE promoter activity by c-Myb 158
V. 3. Transcription factors and nuclear receptors involved in apoCII gene regulation 161
V. 3. 1. Regulation of apoCII expression in macrophages through interaction between apoCII promoter and ME.2 161
V. 3. 2. Modulation of apoCII expression by STAT1 transcription factors 164
V. 3. 3. Modulation of apoCII expression by RXR 170
V. 3. 4. ApoCII promoter transactivation through interaction of STAT1 with RXR 171
VI. Conclusions 175
VII. References 178
Papers …..... 207
International scientific presentations…..……...……...…..... 208
National science presentations ...……..... 210
Additional research education during PhD. Stage 211
Research funding …..... 212
Abreviations 213

Keywords

ATHEROSCLEROSIS
APOLIPROTEIN
GENE EXPRESSION REGULATION
REGULATORY ELEMENT
TRANSCRIPTION FACTOR
MACROFAGES
STAT1
RXR

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease that affects elastic arteries (aorta, carotid, iliac) as well as muscular arteries (coronary, renal). Early in the last century, Nikolai Anitschkow discovered the role of plasma cholesterol in atherosclerosis development. Later the generation transgenic mice made possible experiments which revealed the role of apolipoproteins in atherogenesis.

Apolipoprotein E is a 35 kDa glycoprotein, synthesized mainly in the liver. However, ApoE is also produced in small amounts in other tissues and cells, including macrophages. ApoE makes an essential contribution in the lipoproteins metabolism as an either major or minor component. ApoE deficiency in animal models as well as in patients with type III hyperlipoproteinemia is associated with premature atherosclerosis. Low or absent expression of apoE in macrophages, leads to atherogenic process. However, transgenic mice expressing apoE only in macrophages do not develop atherosclerosis even when their plasma apoE levels are low and the animals are hypercholesterolemic. In contrast, transgenic mice with normal plasma apoE levels and no apoE expression in macrophages, are prone to atherosclerosis. Atheroprotective role of apoE is mainly due to the fact that apoE is involved in the clearance of atherogenic plasma lipoproteins (acting as a ligand for several members of LDL receptor family) and of the excess of cholesterol from cells (facilitating the reverse cholesterol transport to the liver). In addition, apoE has many other beneficial effects: is antioxidant, inhibits platelet aggregation, stimulates production of nitric oxide, inhibits T-cell activation, etc. ApoE is considered an important therapeutic target for the prevention and treatment of atherosclerosis for its modulation that could lead to major beneficial effects in the metabolism of lipoproteins.

Apolipoprotein CII is another plasma protein, associated with chylomicrons and VLDL particles. ApoCII is the main activator of lipoprotein lipase, an enzyme that hydrolyzes triglycerides in chylomicrons and VLDL, providing free fatty acids to the cells. The main sites of apoCII synthesis are represented in the liver and intestine, but apoCII can be also synthesized in the macrophages infiltrated in the atherosclerotic plaque. Patients having apoCII deficiency are unable to clear plasma triglyceride-rich lipoproteins and therefore develop type I hyperlipidemia, characterized by hypertriglyceridemia, xanthomas and increased risk for pancreatitis and atherosclerosis. Studies using transgenic mice have shown that not only apoCII deficiency but also apoCII overexpression induces severe hypertriglyceridemia. Thus, high concentration of apoCII inhibits the activity of lipoprotein lipase, the maturation of HDL particles, and the reverse cholesterol transport and clearance

of lipoproteins by apoE receptors. Therefore, maintaining an optimal level of apoCII expression is essential for the normal metabolism of lipoproteins.

The aim of this thesis is to elucidate the regulatory mechanisms of apoE and apoCII gene expression (apolipoproteins with essential role in lipoprotein metabolism and atherosclerosis) in cell types with key role in the atherosclerotic process.

Modulation of ApoE gene expression. During monocytes differentiation into macrophages, apoE gene expression is induced at transcriptional level by the interaction between promoter and distal regulatory elements, interaction facilitated by binding of several transcriptional factors. The results obtained by 3C technique (chromosome conformational capture) have demonstrated that apoE promoter interacts with the distal regulatory elements ME.2 and ME.1 in monocytes differentiated into macrophages by PMA treatment. Interaction of apoE promoter with multienhancers takes place in the opposite orientation of the two DNA fragments, the sense of orientation being confirmed also by transient transfection experiments.

The multienhancer 2 induced ~ 9-fold the activity of apoE promoter in RAW 264.7 cells, but not in THP-1 monocytes or other cell types tested (HepG2 and HEK293 cells), confirming that the distal regulatory element has a specific action on the apoE promoter in macrophages. The region -100/+73 is the minimum apoE promoter fragment that can be activated by multienhancer 2. The results showed that the whole sequence of ME.2 is necessary for an optimal interaction with the apoE promoter, and for the modulation of apoE promoter activity. In addition the 5'-terminal region of the multienhancer 2 is more important than 3`-terminal region. ME.2 is a transcriptional enhancer that induces the activity of all promoters located in the apoE/apoCI/apoCIV/apoCII gene cluster in macrophages. Studies have shown that ME.2 increases the activity of the four promoters of the gene cluster in the following order apoE>apoCII>apoCIV>apoCI.

The complexity of apoE gene regulation is the result of the interaction of various transcription factors with the proximal and distal regulatory elements, depending on the cell type in which takes place the protein biosynthesis. The role of the transcription factors PU.1, AP-1, STAT1, C/EBP and c-Myb in the modulation of apoE gene expression was tested by transient transfection experiments in two cell types: hepatocytes (the major site of apoE synthesis) and macrophages (peripheral source of apoE, important for its implications in atherogenesis process).

Data showed that PU.1 transcription factors, involved in differentiation of monocytes into macrophages, have a positive role in apoE regulation especially in macrophages, acting indirectly on the apoE promoter through multienhancer 2.

C/EBPα and C/EBPβ transcription factors have an opposite effect in the apoE regulation in macrophages and hepatocytes. Whereas C/EBP overexpression in macrophages decreased the apoE proximal promoter activity, the C/EBP overexpression in hepatocytes resulted in a significant increase in the apoE promoter activity. Interestingly, C/EBPα had a more pronounced effect on apoE promoter activity in hepatocytes, while C/EBPβ had a more pronounced effect in macrophages.

AP-1 transcription factors have opposite effects on the apoE expression in macrophages and hepatocytes. The overexpression of transcription factors c-Jun, c-Fos, Jun B and Jun D in RAW 264.7 macrophages resulted in a decrease of apoE proximal promoter activity and gene expression, whereas overexpression of these factors in HepG2 hepatocytes significantly increased the apoE promoter activity and the amount of mRNA synthesized. The experimental results showed that overexpression of c-Jun decreased the apoE promoter activity even in the presence of SP inhibitor, suggesting that the action of c-Jun on apoE promoter is not dependent on c-Jun phosphorylation.

Experimental results have shown that overexpression of CHOP transcription factors in macrophages and hepatocytes induced a significant decrease in apoE promoter activity, suggesting that under inflammation and stress conditions the amount of apoE synthesized by macrophages will be significantly reduced.

Data showed that c-Myb transcription factors have a positive role in the regulation of apoE expression for c-Myb overexpression induced a significant increase of apoE proximal promoter activity in both RAW 264.7 macrophages and HepG2 hepatocytes. In addition, c-Myb overexpression in HEK cells increased ~ 2 times the apoE gene expression.

Induction of differentiation of monocytes into macrophages by PMA treatment is accompanied by an increased expression of apoE and STAT1. Overexpression of STAT1 transcription factor induces activation of apoE promoter through interaction with ME.2. STAT1 proteins bind to ME.2 and induce indirectly the activation of apoE gene transcription in macrophages (but not in hepatocytes). The STAT1 binding site on multienhancer 2 was identified by multiple experimental pathways: transient transfection, precipitation of proteins bound on biotinylated DNA and chromatin immunoprecipitation.

Modulation of ApoCII gene expression. The results presented in this paper demonstrated that multienhancer 2 interacts with apoCII gene promoter in macrophages. This interaction facilitates transcriptional activation of apoCII promoter through STAT1 transcription factors. We identified a new STAT1 binding site in the region -500/-493 of apoCII promoter, responsible for apoCII activation by STAT1 through transient transfection experiments, the precipitation of proteins bound on biotinylated DNA, and chromatin immunoprecipitation. Interestingly, STAT1 did not exert the stimulatory effect on apoCII promoter when its sequence contained a mutation in RXRα/T3Rβ binding site, suggesting that STAT1 activates the apoCII promoter through interaction with RXRα. For the first time we identified the physical interaction of STAT1 and RXRα transcription factors using the techniques of precipitation of recombinant proteins fused with GST and co-immunoprecipition. Transactivation of apoCII promoter by STAT1 is amplified by RXR ligand in macrophages, indicating that STAT1 and RXRα are important activators of apoCII expression.

Given the essential role of apoE and apoCII in the lipoprotein metabolism, these apolipoproteins are considered important target molecules in the treatment of atherosclerosis. However, the data indicates that apoE or apoCII systemic overexpression in transgenic mice resulted in hypertriglyceridemia. Therefore, the development of strategies to increase the expression of these proteins in certain cell types with key role in atherosclerotic process is imperative.in order to prevent or reduce atherosclerosis. The results presented in this paper demonstrate the specificity of interactions between proximal and distal regulatory elements of apoE or apoCII genes. Through binding of certain transcriptional factors to the distal regulatory elements, the gene expression of these apolipoproteins can be modulated specifically depending on the cell type.

The results of this thesis will contribute to a better understanding of the regulatory mechanisms of apoE and apoCII gene expression, that could lead to the discovery of new strategies in the treatment or prevention of atherosclerosis by increasing the expression of apolipoproteins with beneficial effects or by inhibiting the activity of molecules that decrease the expression of these apolipoproteins.

Académie Roumaine
Institut de Biologie Cellulaire et de Pathologie
„Nicolae Simionescu"

THÈSE

Modulation de l'expression des gènes des apolipoprotéines avec potentiel thérapeutique dans l'athérosclérose

Résumé

Directeur de thèse

Acad. Maya Simionescu

Doctorand

Trușcă Georgeta Violeta

BUCAREST
2013

SOMMAIRE

I ere Partie

Le niveau actuel des connaissances

Présentation 5

I. Métabolisme des lipoprotéines dans les conditions normales et pathologiques 7

I. 1. Classification et composition des lipoprotéines 7

I. 2. Caractéristiques générales des apolipoprotéines 14

I. 3. Métabolisme des chylomicrons, VLDL, LDL, IDL et HDL 19

I. 4. Implication des lipoprotéines dans la pathologie vasculaire, l'athérosclérose 22

I. 5. L'efflux de cholestérol à partir des cellules, un processus anti-athérosclérotique … 26

II. Caractérisation structurale et fonctionnelle a apoE et apoCII 31

II. 1 Apolipoprotéine E 31

II. 1. 1. Structure du gène apoE 32

II. 1. 2. Régulation de gène apoE 32

II. 1. 3. Structure de la protéine apoE 35

II. 1. 4. Isoformes apoE 36

II. 1. 5.Récepteurs apoE 41

II. 1. 6. Rôle de l'apolipoprotéine E et son implication dans l'athérosclérose 44

II. 2. Apolipoprotéine CII 49

II. 2. 1. Structure du gène apoCII 49

II. 2. 2. Régulation de gène apoCII 50

II. 2. 3. Structure de la protéine apoCII 51

II. 2. 4. Fonctions principales de l'apoCII 54

III. Régulation de l'expression des gènes 56

III. 1. Éléments de régulation génique proximale et distale 56

III. 2.Le mécanisme d'initiation de la transcription du gène 58

III. 3. Les facteurs de transcription et des récepteurs nucléaires impliqués dans la modulation de l'expression d'un gène 60

III. 3. 1. Facteurs impliqués dans la différenciation des macrophages 61

III. 3. 2. Le complexe des facteurs de transcription AP-1 66

III. 3. 3. Les facteurs de transcription STAT 77

III. 3. 4. Les facteurs de transcription c-Myb 81

III. 3. 5. Récepteurs nucléaires RXR 83

II-eme Partie

Les contributions originales

IV. Matériel et méthodes 86
IV. 1. Cultures cellulaires 86
IV. 2. Les plasmides 87
IV. 2. 1. Les plasmides contenant des éléments de régulation de l'apoE 87
IV. 2. 2. Les plasmides contenant des éléments de régulation de l'apoCII …..... 90
IV. 2. 3. Les plasmides contenant des éléments de régulation de l'apoCI et apoCIV 90
IV. 2. 4. Clonage de plasmides (+)ME.2-luc şi (-)ME.2-luc 91
IV. 2. 5. Construction du plasmide donnant lieu à des shRNA pour l'inhibition de STAT1 …..... 94
IV. 2. 6. Le clonage de promoteur CMV dans pGL3 vecteur 97
IV. 2. 7. Clonage de pCMV-CHOP dans Sport6 vecteur 99
IV. 3. Transfection transitoire 101
IV. 4. Détermination de l'activité enzymatique de la luciférase et β-galactosidase 102
IV. 5. Détermination de la concentration de protéines 103
IV. 6. Précipitations de protéines liées à l'ADN biotinylé 103
IV. 7. Imunotransfer 106
IV. 8. Technique 3C (chromosome capture conformationnel) 107
IV. 9. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) 108
IV. 10. Technique de précipitation des protéines de fusion GST recombinantes 108
IV. 11. Co-immunoprécipitation 109
IV. 12. L'inhibition de l'expression du gène de STAT1 109
IV. 13. RT-PCR 110
IV. 14. Real Time PCR ……..…..... 111
IV. 15. Analyse statistique des résultats 113
V. Résultats et discussion 114
V. 1. Régulation de l'expression des gènes lors de la différenciation des monocytes en macrophages 114
V. 1. 1. Modulation de l'expression apoE par PMA au cours de la différenciation des monocytes 114
V. 1. 2. Régulation de l'expression ApoE grâce à l'interaction avec l'élément réglementaire distale du promoteur, ME.2, en particulier dans les macrophages 117

V. 1. 3. Interaction de détermination des éléments réglementaires distales du promoteur apoE cours de la différenciation des monocytes en macrophages 122
V. 1. 4. Identification du fragment minimum du promoteur apoE qui peut être activé par multienhancer 2. 128
V. 1. 5. Identification de la région minimum de ME.2 chargée de stimuler le promoteur transcriptionnel apoE 130
V. 1. 6. Effet de l'interaction de ME.2 avec d'autres promoteurs du cluster de gènes apoE/apoCI/apoCIV/apoCII dans les macrophages 132
V. 2. Les facteurs de transcription et les récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation du gène de l'ApoE 134
V. 2. 1. Modulation de l'expression apoE par des facteurs de transcription PU.1 134
V. 2. 2. Modulation de l'expression apoE par des facteurs C/EBP 136
V. 2. 3. Modulation de l'expression apoE par des facteurs de transcription AP-1 141
V. 2. 4. Action indirecte de STAT1 sur le promoteur apoE par ME.2 146
V. 2. 5. L'inhibition de l'expression de l'apoE par l'action des facteurs de stress 155
V. 2. 6. La régulation positive de l'activité du promoteur apoE par c-myb 158
V. 3. Les facteurs de transcription et des récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation génique apoCII 161
V. 3. 1. Réglage d'expression apoCII par l'interaction avec le promoteur ME.2 dans les macrophages …..... 161
V. 3. 2. Modulation de l'expression apoCII par les facteurs de transcription STAT1 164
V. 3. 3. Modulation de l'expression apoCII par RXR …..... 170
V. 3. 4. Transactivation du promoteur apoCII par l'interaction de STAT1 avec RXR 171
VI. Conclusions 175
VII. Bibliographie 178
Les articles publiés 210
Communication scientifiques internationales.....…...…….....…..... 211
Communications scientifiques nationales…….....……..... 213
Stages et cours de formation au decours du stage doctoral …..... 214
Financement de la recherche 215
Liste des abréviations …..... 216

MOTS-CLÉS

ATHEROSCLEROSE
APOLIPROTEINE
REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES
ELEMENT DE REGULATION
FACTEUR DE TRANSCRIPTION
MACROFAGES
STAT1
RXR

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique qui affecte les artères élastiques (aorte, carotide, iliaque) et musculaires (coronaires, rénales). Au début du dernier siècle, Nikolai Anitschkow a révélé le rôle du cholestérol plasmatique et des lipoprotéines dans le développement de l'athérosclérose, le rôle des apolipoprotéines dans l'athérogenèse étant démontré après l'apparition des modèles expérimentaux des souris transgéniques marquée.

L'apolipoprotéine E (ApoE) est une glycoprotéine de 35 kDa, synthétisée principalement par le foie mais aussi par d'autres tissus et cellules, y compris les macrophages. ApoE est un composant majeur ou mineur des lipoprotéines et intervient de manière essentielle dans leur métabolisme. La carence de l'apolipoprotéine E dans les modèles animaux et chez les patients diabétiques de type hyperlipoproteinemia III est associée à l'athérosclérose précoce. L'expression faible ou absente de l'apoE dans les macrophages, conduit à un processus athérogène, mais les souris transgéniques exprimant l'apoE seulement dans les macrophages ne développent pas d'athérosclérose, même lorsque les niveaux plasmatiques de l'ApoE sont faibles et les animaux sont hypercholestérolémiques. En revanche, les souris transgéniques avec des niveaux de plasma apoE normale, mais sans ApoE exprimé dans les macrophages sont susceptibles de développer une athérosclérose. Le rôle atheroprotecteur de l'apoE est principalement dû au fait que cette protéine est impliquée dans la clearance des lipoprotéines plasmatiques athérogènes (agissant comme un ligand pour plusieurs membres de la famille des récepteurs LDL) et le cholestérol en excès present dans les cellules (en facilitant le transport inverse du cholestérol vers le foie). En outre, l'apoE a de nombreux autres avantages: antioxydant, inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, stimulation de la production d'oxyde nitrique, inhibiteur l'activation des lymphocytes T, etc. Etant donné que la modulation de l'expression de l'apoE peut entraîner des effets bénéfiques dans le métabolisme des lipoprotéines, l'apoE est considérée comme une cible thérapeutique importante pour la prévention et le traitement de l'athérosclérose.

L'apolipoprotéine apoCII est une autre protéine plasmatique, associée en particulier avec les chylomicrons et les particules VLDL. L'ApoCII est le principal activateur de la lipoprotéine lipase, une enzyme qui hydrolyse les triglycérides dans les chylomicrons et VLDL. Les principaux sites de synthèse de l'apoCII sont représentés par le foie et l'intestin, mais l'apoCII peut être synthétisé par les macrophages infiltrant la plaque d'athérome. Les patients déficients en ApoCII sont incapables d'éliminer du plasma les lipoprotéines riches en triglycérides et développent une l'hyperlipidémie de type I, caractérisée par

hypertriglycéridémie, xanthomes et un risque élevé de pancréatite et d'athérosclérose. Des études utilisant des souris transgéniques ont montré que non seulement la carence en ApoCII mais aussi la surexpression de l'apoCII induit une hypertriglycéridémie sévère. Ainsi, l'apoCII a concentration elevée inhibe l'activité de la lipoprotéine lipase, la maturation des particules HDL, le transport inverse du cholestérol et l'élimination des lipoprotéines par le biais de récepteurs de l'apoE. Par conséquent, le maintien d'un niveau optimal de l'expression de l''apoCII est essentielle pour le métabolisme normal des lipoprotéines.

L'objectif de cette thèse est de déchiffrer les mécanismes de régulation de l'expression des gènes de l'apoE et de l'apoCII (apolipoprotéines avec rôle dans le métabolisme des lipoprotéines et l'athérosclérose) dans les cellules qui jouent un rôle essentiel dans l'athérosclérose.

Modulation de l'expression de gène ApoE. Au cours de la différenciation des monocytes en macrophages l'expression du gène de l'ApoE est induite au niveau transcriptionnel par l'interaction du promoteur avec les éléments régulateurs distaux, interaction facilitée par la liaison de certains facteurs de transcription. Les résultats obtenus par la technique de 3C (chromosome conformation capture) ont démontré que, dans les monocytes qui se sont différencié en macrophages par un traitement avec de la PMA, le promoteur de l'apoE interagit avec les éléments de régulation distaux ME.1 et ME.2. L'interaction du promoteur avec la séquence d'enhancer se déroule dans l'orientation opposée entre les deux fragments d'ADN l' interaction optimale étant confirmés par des expériences de transfection transitoire.

Multienhancer 2 a induit x9 l'activité du promoteur d'apoE fois dans les cellules RAW 264.7, mais pas dans les monocytes THP-1 et d'autres types cellulaires testés (cellules HepG2 et HEK293), confirmant ainsi que l'élément régulateur distal a une activité spécifique du promoteur de l'apoE dans les macrophages. Le fragment minimum du promoteur de l'apoE qui peut être activée par multienhancer 2 est la région -100/+73. Les résultats ont montré que la séquence entière de ME.2 est nécessaire pour une interaction optimale avec du promoteur l'apoE et pour moduler l'activité du promoteur de l'apoE, la région 5'-terminale de multienhancer 2 est plus importante que la région 3`-terminale. ME.2 est un activateur de la transcription induisant l'activité de tous les promoteurs du groupe de gènes apoE/apoCI/ apoCI`/apoCIV/apoCII dans les macrophages. Nos résultats ont montré que ME.2 augmente l'activité des quatre promoteurs du cluster dans l'ordre suivant apoE>apoCII>apoCIV>apoCI.

La complexité de la régulation du gène de l'apoE est le résultat de l'interaction de nombreux facteurs de transcription avec les éléments proximaux et distaux de régulation, en fonction du type de cellule dans laquelle se produit la biosynthèse de la protéine. Le rôle des facteurs de transcription PU.1, AP-1, STAT1, C/EBP et c-Myb dans la modulation de l'expression apoE a été testé par des expériences de transfection transitoire menées dans deux types cellulaires: hépatocytes (le site majeur de synthèse d'apoE) et macrophages (source périphérique d'apoE, très important car il a des implications pour le processus d'athérogenèse).

Les résultats montrent que les facteurs de transcription de la famille PU.1, impliqués dans la différenciation des monocytes en macrophages, ont un rôle positif dans la régulation de l'apoE spécifiquement dans les macrophages, agissant indirectement sur le promoteur de l'apoE par l'intermediare du multienhancer 2. Les facteurs de transcription C/EBPα et C/EBPß ont un effet inverse dans la régulation de l'apoE dans les macrophages et les hépatocytes; alors que la surexpression de C/EBP dans les macrophages induit l'activité du promoteur proximal de l'apoE, la surexpression de C/EBP dans les hépatocytes entraîne une augmentation significative de l'activité du promoteur. Fait intéressant, C/EBPα eu un effet plus prononcé sur l'activité du promoteur dans les hépatocytes, mais C/EBPß eu un effet plus prononcé dans les macrophages.

Les facteurs AP-1 ont des effets opposés sur l'expression de l'apoE dans les macrophages et les hépatocytes. La surexpression de facteurs de transcription c-Jun, c-Fos, Jun B et Jun D dans des macrophages RAW 264.7 a entraîné une diminution de l'activité du promoteur proximal apoE et de l'expression des gènes, alors que la surexpression de ces facteurs dans les hépatocytes HepG2 a augmenté de façon significative l'activité du promoteur et la quantité d'ARNm synthétisé. Les résultats expérimentaux ont montré que la surexpression de c-Jun entraîne une diminution de l'activité du promoteur d'ApoE, même en présence d'un inhibiteur SP, ce qui suggère que l'action de c-Jun sur le promoteur d'apoE n'est pas dépendant de la phosphorylation de c-jun.

Les résultats expérimentaux ont montré que dans les macrophages et dans les hépatocytes, la surexpression des facteurs de transcription CHOP induit une diminution significative de l'activité du promoteur proximal d'apoE, ce qui suggère que dans les conditions de l'inflammation et de stress, la quantité d'apoE synthétisée par les macrophages est réduite. Les résultats ont montré que les facteurs de transcription c-Myb ont un rôle positif dans la régulation de l'expression d'apoE, alors que la surexpression de c-Myb a induit une augmentation significative de l'activité du promoteur proximal apoE dans les

macrophages RAW 264.7 et les hépatocytes HepG2. En outre, la surexpression de c-Myb dans les cellules HEK a augmenté deux fois l'expression du gène d'apoE.

L'induction de la différenciation des monocytes en macrophages par un traitement avec de la PMA est accompagnée par une augmentation de l'expression de l'apoE et STAT1. La surexpression du facteur de transcription STAT1 induit l'activation du promoteur d'apoE grâce à l'interaction avec ME.2. Les protéines STAT1 se lient à la séquence ME.2 et détermine l'indirectement activation de la transcription du gène de l'apoE dans les macrophages (mais pas dans les hépatocytes). Le site de liaison des facteurs de transcription STAT1 sur multienhancer 2 a été identifié par de multiples voies expérimentale: transfection transitoire, précipitation de protéines sur l'ADN biotinylé et immunoprécipitation de la chromatine.

Modulation de l'expression de gène ApoCII. Les résultats présentés dans ce document démontrent que dans les macrophages multienhancer 2 peut interagir avec le promoteur du gène apoCII et cette interaction facilite l'activation transcriptionnelle du promoteur apoCII par les facteurs de transcription STAT1. Par d'expériences de transfection transitoire, la précipitation des protéines sur ADN biotinylé et immunoprécipitation de la chromatine nous avons identifié un nouveau site de liaison de STAT1 sur région -500/-493 du promoteur apoCII, responsable de l'activation induite par STAT1.

STAT1 n'a pas exercité son effet stimulant sur l'activité du promoteur apoCII lorsque sa séquence contient une mutation dans le site de liaison de RXRα/T3R β, ce qui suggère que le STAT1 active l'apoCII promoteur par l'interaction avec RXRα. En utilisant les techniques de précipitation des protéines recombinantes avec GST et co-immunoprecipitation nous avons demontré pour la première fois une interaction physique entre les facteurs de transcription STAT1 et RXRα. La transactivation du promoteur d'apoCII par STAT1 est amplifié par le ligand RXR dans les macrophages, ce qui indique que STAT1 et RXR sont des activateurs importants dans l'expression d'apoCII.

Compte tenu du rôle essentiel de l'apoE et apoCII dans le métabolisme des lipoprotéines, ces apolipoprotéines sont des molécules cibles importantes pour le traitement de l'athérosclérose. Malgré les nombreux effets favorables de ces apolipoprotéines, la surexpression des apoE ou apoCII chez des souris transgéniques ont donné lieu à l'apparition d'une hypertriglycéridémie. Par conséquent, afin de prévenir ou de réduire l'athérosclérose il est nécessaire d'élaborer des stratégies visant à accroître l'expression de ces protéines seulement dans certains types de cellules ayant un rôle clé dans l'athérosclérose. Les résultats présentés dans ce document montrent la spécificité des interactions entre les

éléments distaux et promoteurs du gène de l'apoE et apoCII. En reliant certains facteurs de transcription à des éléments régulateurs distaux, l'expression de ces apolipoprotéines peut être ajustée notamment en fonction du type de cellule. Les résultats de cette étude contribueront à une meilleure compréhension des mécanismes régulant l'expression des gènes de l'apoE et apoCII, ce qui pourrait conduire à la découverte de nouvelles stratégies pour le traitement ou la prévention de l’athérosclérose par l’augmentation de l’expression "bénéfique" des apolipoprotéines ou en inhibant l'activité des molécules qui diminuent l'expression de ces apolipoprotéines.

Academia Română
Institutul de Biologie şi Patologie Celulară
„Nicolae Simionescu"

TEZA DE DOCTORAT

Modularea expresiei genice a apolipoproteinelor cu potenţial terapeutic in ateroscleroză

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător Ştiintific

Acad. Maya Simionescu

Doctorand

Truşcă Georgeta Violeta

BUCUREŞTI
2013

CUPRINS

Partea I

Nivelul actual al cunoştintelor

Introducere 5

I. Metabolismul lipoproteinelor in condiţii normale şi patologice 7

I. 1. Clasificarea şi compoziţia lipoproteinelor 7

I. 2. Caracteristici generale ale apolipoproteinelor 14

I. 3. Metabolismul chilomicronilor, VLDL, LDL, IDL şi HDL 19

I. 4. Implicarea lipoproteinelor in patologia vasculară, ateroscleroza 22

I. 5. Efluxul de colesterol din celule, proces antiaterosclerotic 26

II. Caracterizarea structurală şi functională a apoE şi apoCII 31

II. 1 Apolipoproteina E 31

II. 1. 1. Structura genei apoE 32

II. 1. 2. Reglarea genică a apoE 32

II. 1. 3. Structura proteinei apoE 35

II. 1. 4. Izoformele apoE 36

II. 1. 5. Receptorii pentru apoE 41

II. 1. 6. Rolul apolipoproteinei E şi implicarea ei in aterosclerază 44

II. 2. Apolipoproteina CII 49

II. 2. 1. Structura genei apoCII 49

II. 2. 2. Reglarea genică a apoCII 50

II. 2. 3. Structura proteinei apoCII 51

II. 2. 4. Principalele funcţii ale apoCII 54

III. Reglarea expresiei genice 56

III. 1. Elemente reglatoare genice proximale şi distale 56

III. 2. Mecanismul iniţierii transcripţiei genice 58

III. 3. Factori de transcripţie şi receptori nucleari implicaţi in modularea expresiei genice 60

III. 3. 1. Factori implicaţi in diferenţierea macrofagelor 61

III. 3. 2. Complexul de factori transcripţionali AP-1 66

III. 3. 3. Factorii de transcripţie STAT 77

III. 3. 4. Factorii de transcripţie c-Myb 81

III. 3. 5. Receptorii nucleari RXR 83

Partea a II a

Contribuţii originale

IV. Materiale şi Metode 86
IV. 1. Culturi celulare 86
IV. 2. Plasmide 87
IV. 2. 1. Plasmide conținând elementele reglatoare ale apoE 87
IV. 2. 2. Plasmide conținând elementele reglatoare ale apoCII 90
IV. 2. 3. Plasmide conținând elementele reglatoare ale apoCI şi apoCIV 90
IV. 2. 4. Clonarea plasmidelor (+)ME.2-luc şi (-)ME.2-luc 91
IV. 2. 5. Construirea plasmidei care generează shRNA pentru inhibiţia STAT1 94
IV. 2. 6. Clonarea promotorului CMV în vectorul pGL3 basic 97
IV. 2. 7. Clonarea CHOP în vectorul pCMV-Sport6 99
IV. 3. Transfecţii tranziente 101
IV. 4. Determinarea activităţii enzimatice a luciferazei şi β-galactozidazei..... 102
IV. 5. Determinarea concentrației proteice 103
IV. 6. Tehnica precipitării proteinelor legate la ADN biotinilat 103
IV. 7. Imunotransfer 106
IV. 8. Tehnica 3C (captura conformațională cromosomală) 107
IV. 9. Imunoprecipitarea cromatinei (ChIP) 108
IV. 10. Tehnica de precipitare a proteinelor recombinante fuzionate cu GST..... 108
IV. 11. Co-imunoprecipitare 109
IV. 12. Inhibiţia expresiei genice a STAT1 109
IV. 13. RT-PCR 110
IV. 14. Real Time PCR 111
IV. 15. Analiza statistică a rezultatelor 113
V. Rezultate şi discuţii 114
V. 1. Reglarea expresiei genice in timpul diferenţierii monocitelor in macrofage 114
V. 1. 1. Modularea expresiei apoE de către PMA in timpul diferenţierii monocitelor .. 114
V. 1. 2. Reglarea expresiei apoE prin intermediul interacției promotorului cu elementul reglator distal, ME.2, in mod specific in macrofage 117
V. 1. 3. Determinarea interacţiei promotorului apoE cu elementele reglatoare distale in timpul diferenţierii monocitelor in macrofage 122

V. 1. 4. Identificarea fragmentului minim al promotorului apoE care poate fi activat de către multienhancerul 2 128
V. 1. 5. Identificarea regiunii minime a ME.2 responsabilă de stimularea transcripţională a promotorului apoE 130
V. 1. 6. Efectul interacției ME.2 cu alti promotori din clusterul genic apoE/apoCI/apoCIV/apoCII în macrofage 132
V. 2. Factori de transcripție și receptori nucleari implicați in reglarea genică a apoE 134
V. 2. 1. Reglarea expresiei apoE de către factorul de transcripție PU.1 134
V. 2. 2. Modularea activităţii promotorului apoE de către factorii C/EBP 136
V. 2. 3. Modularea expresiei apoE de către factorii transcriptionali AP-1 141
V. 2. 4. Acțiunea indirectă a STAT1 asupra promotorului apoE prin intermediul ME.2 146
V. 2. 5. Inhibiția expresiei apoE sub acțiunea factorilor de stres 155
V. 2. 6. Reglarea pozitivă a activităţii promotorului apoE de către c-Myb 158
V. 3. Factori de transcripție și receptori nucleari implicați in reglarea genică a apoCII 161
V. 3. 1. Reglarea expresiei apoCII in macrofage prin interacția promotorului cu ME.2 161
V. 3. 2. Modularea expresiei apoCII de către factorul de transcripție STAT1 164
V. 3. 3. Modularea expresiei apoCII prin intermediul RXR 170
V. 3. 4. Transactivarea promotorului apoCII prin intermediul interacției STAT1 cu RXR 171
VI. Concluzii 175
VII. Bibliografie 178
Lucrări publicate 207
Comunicări la manifestări ştiinţifice internaţionale ……...……...…..... 208
Comunicări stiinţifice naţionale ……..... 210
Stagii şi cursuri de specializare efectuate in cadrul stagiului de doctorat 211
Finanţarea cercetărilor 212
Lista abrevierilor 213

CUVINTE CHEIE

ATEROSCLEROZA
APOLIPOPROTEINA
REGLAREA EXPRESIEI GENICE
ELEMENT REGLATOR
FACTOR DE TRANSCRIPTIE
MACROFAGE
STAT1
RXR

Ateroscleroza este o boală inflamatorie cronică care afectează arterele elastice (aorta, carotida, iliaca) şi musculare (coronare, renale). Incă de la începutul secolului trecut, Nikolai Anitschkow a dezvăluit rolul colesterolului şi al lipoproteinelor plasmatice în dezvoltarea aterosclerozei, iar după ce a fost posibilă generarea şoarecilor transgenici, a fost evidenţiat şi rolul apolipoproteinelor în aterogeneză.

Apolipoproteina E este o glicoproteină de 35 kDa, sintetizată în special de către ficat, dar şi de alte ţesuturi şi celule, inclusiv macrofage. ApoE reprezintă un component major sau minor al lipoproteinelor şi are o contribuţie esenţială în metabolismul acestora. Deficienţa apoE, atât în cazul modelelor animale cât şi in cazul pacienţilor cu hiperlipoproteinemie de tip III este asociată cu apariţia prematură a aterosclerozei. Expresia apoE scăzută sau absentă la nivelul macrofagelor, conduce la apariţia procesului aterogen, iar şoarecii transgenici care exprimă apoE doar în macrofage nu dezvoltă ateroscleroză, chiar şi atunci când nivelele apoE plasmatice sunt scăzute şi animalele sunt hipercolesterolemice. În contrast, şoarecii transgenici cu nivele apoE plasmatice normale, dar care nu exprimă apoE în macrofage sunt predispuşi la ateroscleroză. Rolul ateroprotector al apoE se datorează în special faptului că participă la îndepărtarea lipoproteinelor plasmatice aterogene (acţionând ca ligand pentru mai mulţi membri ai familiei de receptori LDL) şi a excesului de colesterol din celule (facilitând transportul invers al colesterolului către ficat). În plus, apoE prezintă multe alte efecte benefice: este antioxidant, inhibă agregarea plachetelor, stimulează producerea oxidului nitric, inhibă activarea celulelor T, etc. Întrucât prin modularea expresiei apoE se pot obţine efecte benefice majore în metabolismul lipoproteinelor, apoE este considerată o ţintă terapeutică importantă pentru prevenirea şi tratamentul aterosclerozei.

Apolipoproteina CII este o altă proteină plasmatică asociată în special particulelor de chilomicroni şi VLDL. ApoCII reprezintă principalul activator al lipoprotein lipazei, enzimă care hidrolizează trigliceridele din chilomicroni şi LDL, furnizând celulelor acizi graşi liberi. Principalele situsuri de sinteză ale apoCII sunt reprezentate de către ficat şi intestin, însă apoCII poate fi sintetizată şi de macrofagele înfiltrate în placa aterosclerotică. Pacienţii cu deficienţă pentru apoCII sunt incapabili să îndepărteze din plasmă lipoproteinele bogate în trigliceride şi prin urmare dezvoltă hiperlipidemie de tip I, caracterizată prin hipertrigliceridemie, xantoame şi risc crescut pentru pancreatită şi ateroscleroză. Studiile realizate folosind şoareci transgenici au demonstrat că nu numai deficienţa apoCII ci şi supraexpresia apoCII induce hipertrigliceridemie severă. Astfel, apoCII în concentraţie mare inhibă activitatea lipoprotein lipazei, maturarea particulelor HDL, transportul invers de colesterol precum şi îndepărtarea lipoproteinelor prin intermediul receptorilor apoE. Prin

urmare, menţinerea unui nivel optim al expresiei apoCII este esenţială pentru metabolismul normal al lipoproteinelor.

Lucrarea de faţă a avut ca scop descifrarea mecanismelor de reglare a expresiei genice a apoE şi apoCII (apolipoproteine cu rol esenţial în metabolismul lipoproteinelor şi implicit în ateroscleroză) în tipuri celulare cu rol cheie în procesul aterosclerotic.

Modularea expresiei genice a ApoE. În timpul diferenţierii monocitelor în macrofage, expresia genică a apoE este indusă la nivel transcripţional prin intermediul interacţiei promotorului cu elementele reglatorii distale, interacţie facilitată de legarea anumitor factorilor transcripţionali. Rezultatele obţinute prin tehnica 3C (captura conformaţională cromosomală) au demonstrat că promotorul apoE interacţionează cu elementele reglatorii distale, ME.1 şi ME.2 în monocite diferenţiate în macrofage prin tratament cu PMA. Interacţia promotorului cu secvenţa multienhancerului are loc în orientarea inversă a celor două fragmente ADN, sensul interacţiei optime fiind confirmat şi prin experimentele de transfecţie tranzientă.

Multienhancerul 2 a indus de ~9 ori activitatea promotorului apoE în celulele RAW 264.7, dar nu şi în monocite THP-1 sau alte tipuri celulare testate (celule HepG2 şi HEK293), confirmând faptul că acest element reglator distal are o acţiune specifică asupra promotorului apoE în macrofage. Fragmentul minim al promotorului apoE care poate fi activat de către multienhancerul 2 este reprezentat de regiunea -100/+73. Rezultatele au arătat că întreaga secvenţă a ME.2 este necesară pentru o interacţie optimă cu promotorul apoE, iar pentru modularea activităţii promotorului apoE regiunea 5`-terminală a multienhancerului este mai importantă decât regiunea 3`-terminală. ME.2 este un enhancer transcripţional care induce activitatea tututor promotorilor genelor din clusterul apoE/apoCI/ apoCI`/apoCIV/apoCII în macrofage. Studiile efectuate au arătat că ME.2 creşte activitatea celor patru promotori din cluster în ordinea următoare apoE>apoCII>apoCIV>apoCI.

Complexitatea reglării genice a apoE este rezultatul interacţiunii a numeroşi factori de transcripţie cu elementele reglatorii proximale sau distale, în funcţie de tipul celular în care are loc biosinteza proteinei. Rolul factorilor de transcripţie PU.1, AP-1, STAT1, C/EBP şi c-Myb în modularea expresiei apoE a fost testat prin experimente de transfectie tranzientă realizate în două tipuri celulare esenţiale: hepatocite (situsul major de sinteză a apoE) şi macrofage (sursa periferică de apoE, foarte importantă deoarece are implicaţii în procesul de aterogeneză).

Datele arată că factorii de transcripţie PU.1, implicaţi în diferenţierea monocitelor în macrofage, au rol pozitiv în reglarea apoE mod specific în macrofage, acţionând indirect asupra promotorului apoE prin intermediul multienhancerului 2.

Factorii de transcripţie C/EBPα şi C/EBPβ au un efect opus în reglarea apoE în macrofage şi hepatocite, întrucât supraexpresia C/EBP în macrofage a indus scăderea activităţii promotorului proximal al apoE, iar supraexpresia C/EBP în hepatocite a determinat o creştere semnificativă a activităţii promotorului. În mod interesant, C/EBPα a avut un efect mai pronunţat asupra activităţii promotorului în hepatocite, iar C/EBPβ a avut un efect mai pronunţat în macrofage.

Factorii din complexul AP-1 au efecte opuse asupra expresiei apoE în macrofage şi hepatocite. Supraexpresia factorilor de transcripţie c-Jun, c-Fos, Jun B şi Jun D în macrofage RAW 264.7 a determinat o scădere a activităţii promotorului proximal al apoE şi a expresiei genice, în timp ce supraexpresia acestor factori în hepatocite HepG2 a crescut semnificativ activitatea promotorului şi a cantităţii de mRNA sintetizată. Rezultatele experimentale au arătat că supraexpresia c-Jun determină scăderea activităţii promotorului apoE chiar şi în prezenţa inhibitorului SP, sugerând faptul că acţiunea c-Jun asupra promotorului apoE nu este dependentă de fosforilarea c-Jun.

Rezultatele experimentale au evidenţiat că atât în macrofage cât şi în hepatocite, supraexpresia factorilor de transcripţie CHOP a indus scăderea semnificativă a activităţii promotorului proximal al apoE, ceea ce sugerează că, în condiţii inflamatorii şi de stres, cantitatea de apoE biosintetizată de către macrofage va fi diminuată.

Datele obţinute arată că factorii de transcripţie c-Myb au rol pozitiv în reglarea expresiei apoE, întrucât supraexpresia c-Myb a indus creşterea semnificativă a activităţii promotorului proximal al apoE atât în macrofage RAW 264.7 cât şi în hepatocite HepG2. În plus, supraexpresia c-Myb în celule HEK a crescut de ~două ori expresia genică a apoE.

Inducerea diferenţierii monocitelor în macrofage prin tratament cu PMA este însoţită de creşterea expresiei apoE şi STAT1. Supraexpresia factorului de transcripţie STAT1 induce activarea promotorului apoE prin intermediul interacţiei cu ME.2. Proteinele STAT1 se leagă la ME.2 şi determină indirect activarea transcripţiei genei apoE, în macrofage (dar nu şi în hepatocite). Situsul de legare al factorilor de transcripţie STAT1 la multienhancerul 2 a fost identificat prin multiple căi experimentale: transfectie tranzientă, precipitarea ADN biotinilat cu streptavidină şi imunoprecipitarea cromatinei.

Modularea expresiei genice a ApoCII. Rezultatele prezentate în această teză au demonstrat că în macrofage multienhancerul 2 poate interacţiona cu promotorul genei

apoCII, iar această interacţie facilitează activarea transcripţională a promotorului apoCII prin intermediul factorilor de transcripţie STAT1. Prin experimente de transfecţie tranzientă, precipitarea ADN biotinilat cu streptavidină şi imunoprecipitarea cromatinei a fost identificat un nou situs de legare a STAT1 în regiunea -500/-493 a promotorului apoCII, responsabil de activarea indusă de STAT1.

În mod interesant, STAT1 nu şi-a exercitat efectul activator asupra promotorului apoCII, atunci când secvenţa acestuia a conţinut o mutaţie în situsul de legare a RXRα/T3R β, sugerând că STAT1 activează promotorul apoCII prin intermediul interacţiei cu RXRα. Folosind tehnicile de precipitare a proteinelor recombinante cu GST şi co-immunoprecipitare a fost evidenţiată pentru prima oară interacţia fizică a factorilor de transcripţie STAT1 şi RXRα. Transactivarea promotorului apoCII de către STAT1 este amplificată de către ligandul RXR în macrofage, evidenţiind faptul că STAT1 şi RXRα reprezintă activatori importanţi ai expresiei apoCII.

Având în vedere rolul esenţial al apoE şi apoCII în metabolismul lipoproteinelor, aceste apolipoproteine reprezintă molecule ţintă importante în terapia aterosclerozei. În ciuda multiplelor efecte benefice ale acestor apolipoproteine, supraexpresia sistemică a apoE sau apoCII la şoarecii transgenici a determinat apariţia hipertrigliceridemiei. Prin urmare, în scopul prevenirii sau reducerii aterosclerozei este nevoie de elaborarea unor strategii de creştere a expresiei acestor proteine doar în anumite tipuri celulare cu rol cheie în procesul aterosclerotic. Rezultatele prezentate în această lucrare demostrează specificitatea interacţiilor dintre elementele reglatorii distale şi promotorii genelor apoE şi apoCII. Prin legarea anumitor factori transcripţionali la elementele reglatorii distale, expresia genică a acestor apolipoproteine poate fi reglată în mod specific în funcţie de tipul celular.

Rezultatele acestui studiu vor contribui la o mai bună înţelegere a mecanismelor de reglare a expresiei genice a apoE şi apoCII, ceea ce ar putea duce la descoperirea unor noi strategii de tratament sau prevenire a aterosclerozei prin creşterea expresiei apolipoproteinelor cu efecte benefice sau prin inhibarea activităţii moleculelor care scad expresia acestor apolipoproteine.

ACADEMIA ROMÂNĂ
Şcoala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Nanoterapii inovatoare pentru boala valvei aortice în diabet

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
Acad. MAYA SIMIONESCU

DOCTORAND:
GEANINA VOICU

2022

Cuprins

INTRODUCERE 11
LISTĂ ABREVIERI 14
I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII 17
I.1 Boala valvei aortice 17
I.1.1 Biologia și ontogeneza valvei aortice 17
I.1.1.1 Organizarea valvei aortice 17
I.1.1.2. Ontogeneza valvei aortice 18
I.1.1.3 Structura valvei aortice 18
a. Celule endoteliale valvulare (VEC) 18
b. Celule interstițiale valvulare (VIC) 19
c. Alte tipuri celulare 20
I.1.2 Calcificarea valvei aortice (CVA) 20
I.1.2.1. Epidemiologia calcificării valvei aortice 20
I.1.2.2. Factori de risc ai calcificării valvei aortice 21
I.1.2.3. Mecanismele celulare și moleculare ale calcificării valvei 22
a. Activarea celulelor endoteliale 23
b. Diferențierea celulelor interstițiale valvulare native (quaiescent, qVIC) în miofibroblaste 24
c. Osteodiferențierea celulelor valvulare interstițiale 25
d. Remodelarea matricei extracelulare 31
e. Formarea nodulilor de calcificare 32
I.1.2.4. Calcificarea valvei aortice (CVA) și ateroscleroza 33
I.1.2.5. Calcificarea valvei aortice în diabet 34
I.2 Abordări terapeutice în calcificarea valvei aortice 36
I.2.1 Înlocuirea chirurgicală a valvei aortice 36
I.2.2 Inhibitori ai moleculelor și căilor de semnalizare implicate în calcificarea valvei aortice 37
I.2.3 Statine 38
I.2.4 Alte tratamente 38
I.3 Folosirea nanoparticulelor în tratamentul bolilor cardiovasculare 39
I.3.1 Tipuri de nanoparticule 39
a. Nanoparticule pe bază de carbon 40
b. Dendrimeri 41
c. Nanoparticule polimerice 41
d. Nanoparticule lipidice 42

I.3.2 Modalități de transport (pasiv/activ) ale nanoparticulelor....44
I.3.2.1 Transportul pasiv al nanoparticulelor....45
I.3.2.2 Transportul activ al nanoparticulelor....46
I.3.3 Molecule utilizabile drept ținte în transportul direcționat al nanoparticulelor la valva aortică afectată....46
I.3.3.1 Molecule de adeziune celulară....47
a. Selectine....47
b. Integrine....49
c. Molecule de adeziune celulară din superfamilia imunoglobulinelor....49
I.3.3.2 Colagen tip IV....51
I.3.4 ARN de interferență....52
I.3.5 Folosirea ARN-ului de interferență în tratamentul bolilor cardiovasculare....55
I.4 Concluzii....57
II. CONTRIBUȚII ORIGINALE....59
STRATEGII NANOTERAPEUTICE PENTRU BLOCAREA PROCESULUI DE OSTEODIFERENȚIERE AL CELULELOR VALVULARE INTERSTIȚIALE (VIC)....60
II.1. Osteodiferențierea VIC indusă de concentrații crescute de glucoză și factori osteogeni - Rolul factorului de transcriere Runx2 în osteodiferențierea VIC....60
II.1.1. Introducere și obiective....60
II.1.2. Protocoale experimentale și metode de analiză....61
II.1.2.1. Materiale....61
II.1.2.2. Culturi celulare....62
a. Izolarea și cultivarea celulelor valvulare interstițiale (VIC)....62
b. Caracterizarea VIC....63
II.1.2.3. Determinarea exprimării proteice a moleculelor osteogene în VIC activate și osteodiferențiate....64
a. Dozarea proteinei totale din lizat celular prin metoda Amido Black....64
b. Identificarea și cuantificarea proteinelor prin tehnica Western Blot....65
II.1.2.4. Evaluarea microscopică a depozitelor de fosfatază alcalină....66
II.1.2.5. Determinarea activității fosfatazei alcaline și a concentrației de calciu în VIC osteodiferențiate....66
II.1.3. Rezultate....67
II.1.3.1. Caracterizarea VIC....67
II.1.3.2. Influența factorilor osteogeni și a concentrațiilor crescute de glucoză asupra exprimării moleculelor osteogene în VIC....68
II.1.3.3. Formarea depozitelor de fosfatază alcalină în VIC osteodiferențiate....70
II.1.3.4. Creșterea activității fosfatazei alcaline și a concentrației de calciu în VIC osteodiferențiate....70

II.1.4. Discuții 71
II.1.5. Concluzii 73
II.2. Folosirea poliplexelor C60-PEI/ARNsh pentru transportul intracelular de ARNsh-Runx2 și blocarea osteodiferențierii VIC 75
II.2.1. Introducere și obiective 75
II.2.2. Protocoale experimentale și metode de analiză 77
II.2.2.1. Materiale 77
II.2.2.2. Multiplicarea plasmidelor ARNsh-Runx2 77
a. Obținerea bacteriilor competente DH5α *E.coli* 77
b. Multiplicarea plasmidelor ARNsh în celule bacteriene competente DH5α *E.coli* 78
c. Izolarea plasmidelor ARNsh 80
II.2.2.3. Sinteza poliplexelor C60-PEI/ARNsh 81
II.2.2.4. Caracterizarea poliplexelor C60-PEI/ARNsh 82
a. Dimensiunea și potențialul Zeta al poliplexelor 82
b. Electroforeză în gel de agaroză 82
d. Test de viabilitate celulară 82
e. Preluarea poliplexelor C60-PEI/Cy3 de către VIC 83
f. Transfecția VIC cu poliplexe C60-PEI/pEYFP 83
II.2.2.5. Determinarea expresiei genice a moleculelor osteogene în VIC transfectate 84
a. Izolarea ARN-ului total 84
b. Revers-transcrierea ARN-ului în ADN complementar 85
c. Cuantificarea în timp real a polimerizării în lanț a ADNc (RT-PCR) 85
II.2.2.6. Determinarea exprimării proteice a moleculelor osteogene din VIC transfectate 86
II.2.2.7. Evidențierea activității fosfatazei alcaline în VIC transfectate 87
a. Evaluarea microscopică a depozitelor de fosfatază alcalină 87
b. Cuantificarea activității fosfatazei alcaline 87
II.2.3. Rezultate 88
II.2.3.1. Caracterizarea poliplexelor C60-PEI/ARNsh 88
a. Dimensiune și potențial Zeta 88
b. Eficiența de împachetare a plasmidului ARNsh în poliplexe C60-PEI/ARNsh 88
c. Citotoxicitatea poliplexelor C60-PEI/ARNsh 89
d. Internalizarea poliplexelor C60-PEI/Cy3 în VIC 89
e. Transfecția VIC folosind poliplexele C60-PEI/pEYFP 89
II.2.3.2. Scăderea nivelului genic și proteic al Runx2 în VIC transfectate cu poliplexe C60-PEI/shRunx2 91
II.2.3.3. Scăderea exprimării proteice a moleculelor osteogene în VIC transfectate cu poliplexe C60-PEI/shRunx2 92

II.2.3.4. Scăderea activității fosfatazei alcaline în VIC transfectate cu C60-PEI/shRunx2 95
a. Blocarea formării depozitelor de fosfatază alcalină.....95
b. Scăderea activității enzimatice a fosfatazei alcaline 97
II.2.4. Discuții.....98
II.2.5. Concluzii 100
II.3. Direcționarea specifică a lipopoliplexelor transportoare de ARNsh către ținte moleculare exprimate de VIC osteodiferențiate.....101
II.3.1. Introducere și obiective.....101
II.3.2. Protocoale experimentale și metode de analiză.....103
II.3.2.1. Materiale 103
II.3.2.2. Culturi celulare în sistem bidimensional (2D) și tridimensional (3D).....103
II.3.2.3. Evaluarea expresiei de colagen IV și VCAM-1 în VIC osteodiferențiate.....104
II.3.2.4. Obținerea lipopoliplexelor transportoare de ARNsh (LPP/ARNsh) direcționate specific.....105
II.3.2.5. Caracterizarea lipopoliplexelor (LPP) 107
a. Dimensiune și potențial Zeta, stabilitate coloidală și fizică.....107
b. Colorare negativă pentru Microscopie Electronică de Transmisie (TEM).....107
c. Efectul electroliților asupra stabilității lipopoliplexelor 108
d. Eficiența de încapsulare a plasmidului în lipopoliplexe 108
e. Determinarea cantității de peptid cuplat la suprafața lipopoliplexelor prin tehnica UHPLC.....109
f. Citotoxicitatea lipopoliplexelor 109
g. Legarea lipopoliplexelor direcționate către colagen IV (ColIV-LPP/shRNA) la matricea extracelulară 110
h. Preluarea LPP direcționate către colagen IV (ColIV-LPP/shRNA) sau VCAM-1 (V-LPP/shRNA) de către VIC 110
i. Testul de hemocompatibilitate 111
II.3.2.6. Transfecția VIC cu lipopoliplexele ColIV-LPP/shRunx2 și V-LPP/shRunx2 în condiții statice 112
a. RT-PCR 112
b. Western blot.....113
II.3.2.7. Transfecția VIC cu lipopoliplexele ColIV-LPP/shRunx2 și V-LPP/shRunx2 în condiții dinamice 114
II.3.2.8. Determinarea activității fosfatazei alcaline și a concentrației de calciu în VIC cultivate în sistem 3D, transfectate cu lipopoliplexe ColIV-LPP/shRunx2 și V-LPP/shRunx2 115
II.3.2.9. Evidențierea depozitelor de calciu în VIC cultivate în sistem 3D și transfectate cu lipopoliplexe ColIV-LPP/shRunx2 și V-LPP/shRunx2.....115
II.3.3. Rezultate.....116

II.3.3.1. VIC osteodiferențiate prezintă o supraexprimare de colagen IV și VCAM-1 116
II.3.3.2. Caracterizarea lipopoliplexelor 118
a. Sinteza lipopoliplexelor 118
b. Dimensiunea, potențialul Zeta și structura lipopoliplexelor 119
c. Stabilitatea coloidală a lipopoliplexelor 120
d. Agregarea indusă de electroliți 121
e. Citotoxicitatea lipopoliplexelor 121
f. Legarea lipopoliplexelor direcționate către colagen IV (ColIV-LPP/shControl) la matricea extracelulară 121
g. Lipopoliplexele direcționate către colagen IV și VCAM-1 sunt preluate eficient de VIC osteodiferențiate 123
h. Hemocompatibilitatea lipopoliplexelor 125
II.3.3.3. Lipopoliplexele cărăuși de shRunx2 determină scăderea expresiei moleculelor osteogene în VIC osteodiferențiate în sistem 2D 125
II.3.3.4. Lipopoliplexele cărăuși de shRunx2 determină scăderea expresiei moleculelor osteogene în VIC osteodiferențiate în sistem 3D 130
II.3.3.5. Lipopoliplexele cărăuși de shRunx2 determină scăderea activității fosfatazei alcaline și a concentrației de calciu în VIC osteodiferențiate în sistem 3D 132
II.3.4. Discuții 133
II.3.5. Concluzii 139
STRATEGII NANOTERAPEUTICE CAPABILE SĂ ÎNCETINEASCĂ PROCESUL DE CALCIFICARE AL VALVEI AORTICE ÎNTR-UN MODEL EXPERIMENTAL MURIN 141
II.4. Biodistribuția lipopoliplexelor transportoare de ARNsh *in vivo* 141
II.4.1. Introducere și obiective 141
II.4.2. Protocoale experimentale și metode de analiză 143
II.4.2.1. Materiale 143
II.4.2.2. Obținerea modelului experimental animal: șoarecele ApoE-deficient diabetic 143
II.4.2.3. Evaluarea expresiei de colagen IV și VCAM-1 la nivelul valvei aortice 144
a. Obținerea de criosecțiuni din valvele aortice murine 144
b. Imunohistochimie 144
II.4.2.4. Obținerea lipopoliplexelor transportoare de ARNsh dublu direcționate către colagen IV și VCAM-1 (ColIV/V-LPP/ARNsh) 145
II.4.2.5. Evaluarea biodistribuției LPP/ARNsh după injectarea intravenoasă în șoareci 145
a. Imagistică de fluorescență *ex vivo* 146
b. Evaluarea biodistribuției LPP/ARNsh după injectarea intravenoasă în șoareci 146
II.4.3. Rezultate 146
II.4.3.1. Evidențierea expresiei de colagen IV și VCAM-1 în valva aortică murină 146
II.4.3.2. Caracterizarea ColIV/V-LPP/ARNsh 147

II.4.3.3. Biodistribuția ColIV/V-LPP/ARNsh în organe.....147
II.4.3.4. Biodistribuția ColIV/V-LPP/ARNsh în valva aortică 149
II.4.3.5. Transfecția *in vivo* folosind lipopoliplexe dublu direcționate transportoare de plasmid ce codifică o proteină fluorescentă 150
II.4.4. Discuții.....151
II.4.5. Concluzii 154
II.5. Evaluarea *in vivo* a efectelor terapeutice ale lipopoliplexelor transportoare de ARNsh-Runx2 155
II.5.1. Introducere și obiective.....155
II.5.2. Protocoale experimentale și metode de analiză.....155
II.5.2.1. Materiale 155
II.5.2.2. Prepararea ColIV/V-LPP transportoare de C60-PEI/shRunx2.....156
II.5.2.3. Model experimental animal: șoarecele ApoE-deficient hiperlipemic diabetic.....157
II.5.2.4. Tehnica Real-Time PCR (RT-PCR).....158
II.5.2.5. Tehnica de imunohistochimie 159
II.5.2.6. Colorarea secțiunilor de valvă aortică murină cu Oil Red O.....159
II.5.2.7. Evaluarea activității fosfatazei alcaline în valva aortică după tratamentul cu ColIV/V-LPP/ARNsh-Runx2 159
II.5.3. Rezultate.....160
II.5.3.1. Scăderea expresiei genice a moleculelor implicate în CVA după tratamentul șoarecilor cu ColIV/V-LPP/ARNsh-Runx2 160
II.5.3.2. Scăderea exprimării proteice a moleculelor implicate în CVA după tratamentul șoarecilor cu ColIV/V-LPP/ARNsh-Runx2 161
II.5.3.3. Blocarea formării depozitelor lipidice la nivelul rădăcinii aortice murine după tratamentul șoarecilor cu ColIV/V-LPP/ARNsh-Runx2 162
II.5.3.4. Scăderea activității fosfatazei alcaline în valva aortică murină după tratamentul șoarecilor cu ColIV/V-LPP/ARNsh-Runx2 163
II.5.4. Discuții.....164
II.5.5. Concluzii 168
CONCLUZII GENERALE 169
Bibliografie 172
VALORIFICAREA REZULTATELOR 214
LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE INTERNAŢIONALE COTATE ISI (7 lucrări).....214
BREVETE 215
LUCRĂRI PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE 216
PREMII 217
BURSA OBȚINUTĂ PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL 217
FINANȚAREA CERCETĂRILOR (GRANTURI) 217

Cuvinte cheie: calcificare valvă aortică, celule valvulare interstițiale, osteodiferențiere, factor de transcriere Runx2, diabet, nanoterapii, poliplexe, lipopoliplexe direcționate, colagen IV, molecula de adeziune a celulelor vasculare VCAM-1, molecule osteogene, depozit de calciu

Număr total de pagini – 219

Număr de figuri în Partea I – 12

Număr de tabele în Partea I – 2

Număr de figuri în Partea II – 43

Număr de tabele în Partea II – 8

Referințe bibliografice – 462

Lucrări publicate în reviste indexate ISI în perioada stagiului de doctorat – 7 (2 autor principal)

Lucrări în pregătire – 2

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale – 3 (autor principal)

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – 1 (autor principal)

Brevete – 1

Bursă obținută pe durata programului doctoral – 1 (bursă doctorală de la Academia Română)

Participarea la proiecte de cercetare naționale legate de tematica tezei de doctorat – 1

Introducere și obiective

Calcificarea valvei aortice este o boală degenerativă care afectează 5% din populația de peste 65 ani, România fiind una dintre țările cu cea mai mare rată de mortalitate din Europa (http://www.romedic.ro/stenoza-aortica). Diagnosticarea timpurie și gestionarea tratamentului sunt de o importanță capitală în terapia bolii valvei aortice, întrucât nu există un tratament care să blocheze progresia acesteia. În cazul pacienților cu simptome grave, intervenția chirurgicală de înlocuire de valvă rămâne singura abordare (Kanwar et al., 2018; Iung et al., 2003), prognosticul sever al bolii nefiind influențat de medicația actuală folosită pentru tratarea simptomelor. Progresia calcificării valvei și necesitatea unei intervenții chirurgicale variază considerabil de la pacient la pacient, în majoritatea cazurilor obstrucția totală înregistrându-se în decurs de 2-5 ani de la instalarea calcificării (Owens et al., 2010).

Valva aortică este alcătuită din trei straturi de celule valvulare interstițiale (VIC) cu rol în menținerea homeostaziei valvei, separate de cavități printr-un strat de celule valvulare endoteliale (VEC) (Rutkovskiy et al., 2017). Principalul proces implicat în calcificarea valvei aortice este diferențierea osteoblastică a VIC sub influența factorului de transcriere asociat Runt 2 (Runx2)/Factorul de legare la nucleu 1 (Cbfa1). Runx2 determină creșterea expresiei unor molecule specifice VIC osteodiferențiate: fosfatază alcalină, osteocalcină, osteopontină, sialoproteină osoasă, și contribuie la depunerea activă de calciu (Hortells et al., 2018).

Deși alterarea metabolismului lipidelor și inflamația sunt implicate în inițierea calcificării valvei aortice, procesul activ de depunere a calciului este cel mai important în

progresia bolii (Pawade et al., 2015). Diabetul zaharat este un factor de risc și de predicție al degenerării valvei aortice, contribuind la progresia calcificării prin inducerea disfuncției celulelor endoteliale valvulare, remodelarea matricei extracelulare, instalarea inflamației și calcificarea ectopică (depunerea calciului în alte țesuturi decât cel osos) (Larrew et al., 2013).

La momentul actual nu se cunosc ținte particulare sau terapii specifice pentru tratamentul bolii valvei aortice în asociere cu diabetul zaharat. Fiind o arie de interes cu evoluție rapidă, nanoterapia bolii valvei aortice are implicații pe plan medical, dar și socio-economic, efectele acesteia fiind îmbunătățirea condiției de viață, creșterea speranței de viață și scăderea morbidității și mortalității.

Scopul prezentei teze de doctorat a fost de a identifica mecanismele și moleculele implicate în osteodiferențierea celulelor valvulare interstițiale, proces principal în calcificarea valvei aortice în asociere cu diabetul zaharat, și dezvoltarea și aplicarea unor strategii nanoterapeutice țintite pentru blocarea acestui proces în vederea reducerii sau combaterii timpurii a calcificării valvei aortice.

Au fost propuse și realizate următoarele **obiective specifice**:

1. Studiul mecanismelor implicate în osteodiferențierea celulelor valvulare interstițiale (VIC) și identificarea de potențiale ținte terapeutice. În cadrul acestui obiectiv s-au descris modificările timpurii și avansate induse, *in vitro*, de concentrații crescute de glucoză și factori osteogeni în VIC.
2. Conceperea, obținerea și caracterizarea unor nanoparticule țintite pentru blocarea osteodiferențierii VIC și validarea efectului terapeutic al acestor nanoterapii folosind modele experimentale *in vitro*. S-au obținut și caracterizat poliplexe formate din fulerena C60-PEI complexată cu plasmide ARNsh și lipopoliplexe direcționate specific, formate prin încapsularea poliplexelor menționate în liposomi. Efectul terapeutic al nanoparticulelor a fost stabilit pe sisteme de culturi celulare bi- și tridimensionale de VIC osteodiferențiate cultivate în mediu cu o concentrație crescută de glucoză și factori osteogeni.
3. Validarea preclinică a nanoterapiilor dezvoltate folosind modelul experimental *in vivo* de șoarece ApoE-deficient hiperlipemic și diabetic. În cadrul acestui studiu s-a demonstrat acumularea lipopoliplexelor țintite obținute și caracterizate anterior *in vitro* în valva disfuncțională și efectul terapeutic al acestor nanoparticule în valva aortică a șoarecilor ApoE-deficienți hiperlipemici și diabetici.

Structura tezei de doctorat

Prezenta teză de doctorat este structurată în două părți principale, divizate în opt capitole.

Prima parte, alcătuită din trei capitole, cuprinde aspecte teoretice cu privire la biologia și patologia valvei aortice, dar și la principalele terapii abordate în boala valvei aortice. **Capitolul 1** descrie anatomia, fiziologia și ontogeneza valvei aortice, cu accent asupra principalelor mecanisme celulare și moleculare implicate în calcificarea valvei aortice în diabet. **Capitolul 2** prezintă pe scurt stadiul actual al abordărilor terapeutice în calcificarea valvei aortice, urmând ca în **Capitolul 3** să se detalieze diferitele tipuri de nanoparticule transportoare de ARN de interferență sau medicamente folosite ca tratament în bolile cardiovasculare, principalele căi de transport ale acestora la valva aortică și mecanismul de acțiune al ARN-ului de interferență în terapia valvei aortice calcificate. De asemenea, în acest capitol se face referire și la moleculele supraexprimate de valva aortică afectată, ce pot fi folosite în direcționarea nanoparticulelor (colagen IV, molecule de adeziune a celulelor vasculare).

Partea a doua a lucrării cuprinde contribuțiile originale, structurate în cinci capitole. În **primul capitol** este descris protocolul de osteodiferențiere al VIC aortice umane (oVIC) *in vitro* folosind mediu de cultură HGMO ce conține concentrații crescute de glucoză și factori osteogeni (acid ascorbic, dexametazonă și β-glicerofosfat), aplicabil atât în cultură bidimensională (2D), cât și tridimensională (3D). În fazele timpurii ale calcificării valvei aortice, după denudarea stratului de VEC, lipidele și celulele imune ajung în stratul subendotelial. Citokinele eliberate de celulele imune inițiază procesul inflamator, determinând remodelarea matricei extracelulare și tranziția fenotipică a VIC la miofibroblaste (aVIC), caracterizate prin supraexpresia actinei α a mușchiului neted și prezența fibrelor de stres. În stadiile avansate, ca răspuns la stimularea pro-osteogenică (inflamație, stres mecanic), are loc osteodiferențierea VIC, principalul proces implicat în calcificarea ectopică a foițelor valvulare. Se cunoaște că diabetul este unul dintre factorii acceleratori ai depunerii active de calciu în valva aortică (Bossé et al., 2009).

Principalele rezultate obținute:

- Mediul HGMO ce conține o concentrație crescută de glucoză și factori osteogeni induce osteodiferențierea VIC (oVIC) prin supraexprimarea moleculelor osteogene (fosfatază alcalină, osteopontină, sialoproteină osoasă, proteină morfogenică osoasă) și
- Creșterea anormală a activității enzimatice a fosfatazei alcaline și acumularea de calciu în oVIC.

Rezultatele acestui studiu au fost publicate în revista Pharmaceutics (factor de impact 6.321) (Voicu et al., 2020).

În **Capitolul 2** al tezei de doctorat este prezentat protocolul de formare al poliplexelor prin complexarea conjugatului fulerenă C60-polietilenimină (C60-PEI) cu plasmide ce conțin secvențe specifice short hairpin ARN (ARNsh) pentru factorul de transcriere Runx2 implicat în osteodiferențierea VIC, caracterizarea și efectul terapeutic indus de silențierea Runx2 în oVIC prin intermediul acestor poliplexe.

Principalele rezultate obținute:

- Conform caracterizării fizico-chimice, poliplexele au dimensiuni de ~ 250 nm la rapoarte N/P mai mari de 25, iar potențialul Zeta crește dependent de raportul N/P, fiind de +15 mV la raportul N/P=25.
- Poliplexele sunt citocompatibile cu VIC umane la toate rapoartele N/P investigate (10, 15, 20, 25).
- Poliplexele sunt preluate eficient de către VIC, fapt dovedit de prezența intracelulară a punctelor roșii reprezentând plasmidul fluorescent Cy3.
- Poliplexele au o capacitate de transfecție ridicată la raportul N/P=25.
- Testele funcționale au arătat că poliplexele ce conțin secvențele plasmidiale ARNsh numerotate cu sh_1 și sh_2 (C60-PEI/sh_1, C60-PEI/sh_2) reduc exprimarea proteică a factorului de transcriere Runx2, dar și a altor proteine implicate în activarea și osteodiferențierea VIC (αSMA, Smad2/3, pSmad2/3, fosfatază alcalină, osteopontină, sialoproteină osoasă, proteină morfogenică osoasă 4).
- Poliplexele C60-PEI/sh_1, C60-PEI/sh_2 scad activitatea fosfatazei alcaline după o singură sau o dublă transfecție a oVIC. Activitatea scăzută a fosfatazei alcaline se menține mai mult de o săptămână de la ultima transfecție (până la 21 zile).

Rezultatele acestui studiu au fost publicate în revista Pharmaceutics (factor de impact 6.321) (Voicu et al., 2020).

Capitolul 3 prezintă protocolul de obținere al lipopoliplexelor ce presupune încapsularea poliplexelor preformate C60-PEI/sh_1 la raportul N/P=25 în liposomi anionici stabilizați cu

polietilenglicol și direcționarea lor specifică către molecule supraexprimate de oVIC: colagenul IV și molecula de adeziune a celulelor vasculare VCAM-1. De asemenea, aceste nanoparticule sunt caracterizate și prin evaluarea potențialului lor de a bloca diferențierea osteoblastică a VIC cultivate în sistem 2D și 3D.

În ciuda eficienței ridicate de transfecție *in vitro*, utilizarea poliplexelor *in vivo* nu a avut efecte terapeutice semnificative, din cauza sarcinilor pozitive ce determină interacțiunea nespecifică cu proteine plasmatice și acumularea acestor poliplexe în ficat și splină (Fischer et al., 2004). Pentru creșterea stabilității poliplexelor în circulația sangvină și pentru a îmbunătăți rata de transfecție, scăzând în același timp toxicitatea, acestea pot fi încapsulate în liposomi stabilizați steric cu polietilenglicol (Ko și Bickel, 2012), ceea ce permite și funcționalizarea liposomilor în vederea unui transport direcționat către situsul afectat (Călin și Mânduțeanu, 2017).

Principalele rezultate obținute:

- oVIC prezintă o supraexpresie a colagenului IV și VCAM-1, molecule ce pot fi folosite pentru direcționarea lipopoliplexelor.
- S-au obținut lipopoliplexe prin încapsularea poliplexelor C60-PEI/sh_1 în liposomi anionici, folosind tehnica de evaporare în fază inversă.
- Caracterizarea fizico-chimică a indicat dimensiuni medii ale lipopoliplexelor de ~ 200 nm și un potențialul Zeta negativ, de -30 mV, acestea fiind dispersii apoase stabile coloidal și electrolitic.
- Lipopoliplexele ColIV-LPP/shControl și V-LPP/shControl sunt cito- și hemocompatibile și sunt preluate într-o proporție crescută de oVIC.
- Lipopoliplexele ColIV-LPP/shRunx2 și V-LPP/shRunx2 determină reducerea semnificativă a nivelului genic și proteic al Runx2 în oVIC, atât în sistem 2D, cât și 3D, ceea ce are ca efect și reducerea nivelelor altor molecule osteogene implicate în osteodiferențierea VIC (osteopontină, sialoproteină osoasă, proteină morfogenică osoasă 2).
- Testele funcționale au arătat că transfecția oVIC cu ColIV-LPP/shRunx2 și V-LPP/shRunx2 scade activitatea fosfatazei alcaline și blochează formarea depozitelor de calciu, printr-un mecanism ce implică scăderea nivelului de Runx2.

Rezultatele acestui studiu au fost publicate în revista International Journal of Molecular Sciences (factor de impact 6.009) (Voicu et al., 2022).

Capitolul 4 cuprinde rezultate obținute *in vivo*, pe un model animal de șoarece ApoE-deficient diabetic și hiperlipemic injectat intravenos cu lipopoliplexe dublu direcționate către colagen IV și VCAM-1 (ColIV/V-LPP/shControl). S-a investigat biodistribuția acestor lipopoliplexe la nivelul organelor murine, și în special la nivelul valvei aortice, lipopoliplexele fiind marcate cu rodamină-DSPE pentru evaluarea localizării lipopoliplexelor în organe *ex vivo* prin tehnica IVIS. Datorită fotostabilității și emisiei în spectrul vizibil, rodamina este folosită cu succes în studiile de imagistică și de microscopie de fluorescență (de Almeida et al., 2007).

Principalele rezultate obținute:

- Valvele aortice ale șoarecilor ApoE-deficienți diabetici și hiperlipemici prezintă o expresie crescută de colagen IV și VCAM-1.
- Lipopoliplexele ColIV/V-LPP/shControl se localizează specific la nivelul valvei aortice, biodistribuția fiind corelată cu prezența expresiei ridicate de colagen IV și VCAM-1 în valvă.
- Expresia fluorescentă a proteinei YFP la nivelul valvelor aortice se menține până la 48 ore de la injectarea ColIV/V-LPP/pEYFP.

Rezultatele prezentate în **Capitolul 5** demonstrează efectul terapeutic al lipopoliplexelor dublu direcționate transportoare de secvențe ARNsh-Runx2 într-un model animal de șoarece ApoE-deficient diabetic și hiperlipemic.

Principalele rezultate obținute:

- Lipopoliplexele ColIV/V-LPP/shRunx2 scad expresia genică și proteică a Runx2 în valva aortică, determinând și reducerea expresiei genice a osteopontinei, osteocalcinei și fosfatazei alcaline. ColIV/V-LPP/shRunx2 determină scăderea nivelului genic de Runx2 și în alte organe (plămân, rinichi, ficat), dar fără semnificație statistică.
- Reducerea nivelului de Runx2 blochează depunerea lipidelor și scade activitatea fosfatazei alcaline în valva aortică.

Rezultatele obținute în cadrul tezei de față au condus la următoarele **concluzii cu caracter original**:

- Concentrațiile crescute de glucoză și factorii osteogeni (acid ascorbic, dexametazonă, β-glicerofosfat) determină o creștere dependentă de timp a exprimării proteice a moleculelor osteogene implicate în activarea (actina α a mușchiului neted) și osteodiferențierea celulelor valvulare interstițiale (VIC) (Runx2, fosfatază alcalină, sialoproteină osoasă, osteopontină). Creșterea nivelului proteic al moleculelor osteogene se asociază cu activitatea ridicată a fosfatazei alcaline și creșterea concentrației de calciu în VIC osteodiferențiate, creșterea fiind direct proporțională cu perioada de expunere la factori osteogeni.
- Nanopoliplexele formate prin complexarea fulerenei (C60)-PEI cu plasmide ARNsh-Runx2 sunt citocompatibile și realizează un transport intracelular eficient de plasmide ARNsh, determinând scăderea nivelului proteic al moleculelor osteogene Runx2, actina α a mușchiului neted, Smad2/3, fosfatază alcalină, sialoproteină osoasă, osteopontină, proteină morfogenică osoasă 4, precum și reducerea activității fosfatazei alcaline.
- Lipopoliplexele formate prin încapsularea poliplexelor C60-PEI/ARNsh-Runx2 în liposomi funcționalizați cu peptide ce recunosc specific colagenul IV și VCAM-1 (ColIV-LPP/ARNsh-Runx2 și V-LPP/ARNsh-Runx2), molecule supraexprimate în valva aortică disfuncțională, sunt nanotransportori adecvați pentru transportul direcționat de plasmide ARNsh-Runx2 *in vivo*. Aceste lipopoliplexe țintite determină scăderea semnificativă a expresiei genice și proteice a moleculelor osteogene în VIC osteodiferențiate cultivate în două sisteme de cultură, bidimensional în monostrat și tridimensional în construcți de tip hidrogel obținut din rădăcină aortică porcină. De asemenea, activitatea fosfatazei alcaline și concentrația de calciu scad semnificativ după transfecția cu lipopoliplexele ColIV-LPP/ARNsh-Runx2 și V-LPP/ARNsh-Runx2.
- *In vivo*, într-un model animal de șoarece ApoE-deficient hiperlipemic diabetic, lipopoliplexele dublu direcționate către colagen IV și VCAM-1 se acumulează selectiv la nivelul valvei aortice disfuncționale. Administrările repetate de lipopoliplexe reduc leziunile aterosclerotice prin scăderea expresiei factorilor osteogeni Runx2, osteopontină, osteocalcină, fosfatază alcalină implicați în calcificarea valvei aortice.

Această teză de doctorat aduce următoarele **contribuţii originale**:

► Stabilirea unui model *in vitro* de osteodiferențiere a celulelor valvulare interstițiale.

► Silențierea factorului de transcriere Runx2 poate reprezenta o strategie nouă terapeutică, eficientă în blocarea osteodiferențierii VIC și a progresiei bolii valvei aortice.
► Dezvoltarea de nanocărăuși de ARNsh specific pentru Runx2, țintiți către valva aortică afectată și adecvați pentru administarea *in vivo*. Acești nanocărăuși sunt lipopoliplexe, și anume liposomi ce încapsulează poliplexe C60-PEI/ARNsh-Runx2, funcționalizați cu peptide de recunoaștere a colagenului IV și a moleculei de adeziune a celulelor vasculare 1 (VCAM-1). Lipopoliplexele blochează diferențierea osteoblastică a celulelor valvulare interstițiale *in vitro* și calcificarea valvei aortice *in vivo,* prin reducerea nivelului factorului de transcriere Runx2 și a altor proteine osteogene (osteopontină, sialoproteină osoasă, fosfatază alcalină, osteocalcină și proteina morfogenică osoasă).

VALORIFICAREA REZULTATELOR

Rezultatele obținute în perioada programului doctoral din cadrul Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu" al Academiei Române au fost valorificate astfel:

- publicate în **7 lucrări în reviste indexate ISI**: **2 ca prim-autor** și **5 în calitate de co-autor**
- prezentate în cadrul **conferințelor internaționale** sub forma **unei prezentări orale** și a **3 postere**
- incluse într-**o aplicație de brevet la OSIM.**

Unul dintre articolele publicate în calitate de prim-autor a fost selectat pentru a ilustra coperta revistei „International Journal of Molecular Sciences" în numărul din aprilie 2022, "VCAM-1 targeted nanocarriers of shRNA-Runx2 for calcific valve disease treatment". Rezultatele cercetării au fost premiate de UEFISCDI prin acordarea a 4 premii.

LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE INTERNAȚIONALE COTATE ISI (7 lucrări)

Prim-autor (2):

1. **Geanina Voicu**, Daniela Rebleanu, Cristina Ana Mocanu, Gabriela Tanko, Ionel Droc, Cristina Mariana Uritu, Mariana Pinteala, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, VCAM-1 Targeted Lipopolyplexes as Vehicles for Efficient Delivery of shRNA-Runx2 to Osteoblast-Differentiated Valvular Interstitial Cells; Implications in Calcific Valve Disease Treatment, International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23, 3824; **IF** în 2022 6.009

2. **Geanina Voicu**, Daniela Rebleanu, Cristina Ana Constantinescu, Elena Valeria Fuior, Letitia Ciortan, Ionel Droc, Cristina Mariana Uritu, Mariana Pinteala, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Nano-Polyplexes Mediated Transfection of Runx2-shRNA Mitigates the Osteodifferentiation of Human Valvular Interstitial Cells, Pharmaceutics, 2020, 12, 507; **IF** în 2020 6.321

Co-autor (5):

1. Cristina Ana Mocanu, Elena Valeria Fuior, **Geanina Voicu**, Daniela Rebleanu, Florentina Safciuc, Mariana Deleanu, Ioana Madalina Fenyo, Virginie Escriou, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, P-selectin targeted RAGE-shRNA lipoplexes alleviate atherosclerosis-associated inflammation, Journal of Controlled Release, 2021, 338, pp. 754–772; **IF** în 2021 10.61
2. Elena Valeria Fuior, Cristina Ana Mocanu, Mariana Deleanu, **Geanina Voicu**, Maria Anghelache, Daniela Rebleanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Evaluation of VCAM-1 Targeted Naringenin/Indocyanine Green-Loaded Lipid Nanoemulsions as Theranostic Nanoplatforms in Inflammation, Pharmaceutics, 2020, 12(11), pp. 1–21, 1066; **IF** în 2020 6.321
3. Monica Tucureanu, Alexandru Filippi, Nicoleta Alexandru, Cristina Ana Constantinescu, Letitia Ciortan, Razvan Macarie, Mihaela Vadana, **Geanina Voicu**, Sabina Frunza, Dan Nistor, Agneta Simionescu, Dan Teodor Simionescu, Adriana Georgescu, Ileana Manduteanu, Diabetes-induced early molecular and functional changes in aortic heart valves in a murine model of atherosclerosis, Diabetes and Vascular Disease Research, 2019, 16(6), 562-576; **IF** în 2019 2.707
4. Elena Valeria Fuior, Mariana Deleanu, Cristina Ana Constantinescu, Daniela Rebleanu, **Geanina Voicu**, Maya Simionescu, Manuela Calin, Functional Role of VCAM-1 Targeted Flavonoid-Loaded Lipid Nanoemulsions in Reducing Endothelium Inflammation, Pharmaceutics, 2019, 11(8), 391; **IF** în 2019 4.773
5. Cristina Ana Constantinescu, Elena Valeria Fuior, Daniela Rebleanu, Mariana Deleanu, Viorel Simion, **Geanina Voicu**, Virginie Escriou, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Targeted Transfection Using PEGylated Cationic Liposomes Directed Towards P-Selectin Increases siRNA Delivery into Activated Endothelial Cells, Pharmaceutics, 2019, 11(1), 47; **IF** în 2019 4.773

BREVETE

1. OSIM aplicație nr. A/00811, inventatori Calin Manuela, Rebleanu Daniela, Constantinescu Cristina Ana, **Voicu Geanina**, Deleanu Mariana, Manduteanu Ileana: „Procedeu de obținere a nanocărăușilor utilizați pentru vectorizarea acidului ribonucleic (ARN) de interferență și livrarea țintită la celulele valvei aortice”

LUCRĂRI PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE:

Prezentări orale (1):

1. **Geanina Voicu**, Daniela Rebleanu, Elena Valeria Fuior, Cristina Ana Mocanu, Maria Anghelache, Mihaela Turtoi, Florentina Safciuc, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, VCAM-1 targeted lipopolyplexes carrying Runx2-shRNA mitigate the osteodifferentiation of 3D-cultured human valvular interstitial cells, Al 42-lea Simpozion Aniversar al Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” și a 38-a Sesiune Științifică Anuală a Societății Române de Biologie Celulară cu participare internațională, București, 2021.

Postere (3):

1. **Geanina Voicu**, Cristina Ana Mocanu, Daniela Rebleanu, Agneta Simionescu, Maya Simionescu, Ileana Manduteanu, Manuela Calin, Down-regulation of Runx2 by C60-PEI/shRNA-Runx2 polyplexes reduces the osteodifferentattion of valvular interstitial cells, Workshop Theravaldis, București, 2020
2. **Geanina Voicu**, Cristina Ana Constantinescu, Daniela Rebleanu, Agneta Simionescu, Maya Simionescu, Ileana Manduteanu, Manuela Calin, Polyplexes carrying a shRNA plasmid down regulate the transcription factor Runx2 in valvular interstitial cells exposed to high glucose concentrations and osteogenic factors, Praga, 2019
3. **Geanina Voicu**, Cristina Ana Constantinescu, Daniela Rebleanu, Agneta Simionescu, Maya Simionescu, Ileana Manduteanu, Manuela Calin, High glucose concentrations potentiate the induction of osteoblast phenotype of valvular interstitial cells exposed to osteogenic factors, The 11th National congress with international participation and The 37th Annual Scientific session of Romanian Society of Cell Biology (sub egida Academiei Române), Constanța, 2019

PREMII

Premierea rezultatelor cercetării UEFISCDI:

1. Cristina Ana Mocanu, Elena Valeria Fuior, **Geanina Voicu**, Daniela Rebleanu, Florentina Safciuc, Mariana Deleanu, Ioana Madalina Fenyo, Virginie Escriou, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu 1 andManuela Calin, Journal of Controlled Release, 2021, 338, pp. 754–772; **IF** în 2021 10.61
2. **Geanina Voicu**, Daniela Rebleanu, Cristina Ana Constantinescu, Elena Valeria Fuior, Letitia Ciortan, Ionel Droc, Cristina Mariana Uritu, Mariana Pinteala, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Nano-Polyplexes Mediated Transfection of Runx2-shRNA Mitigates the Osteodifferentiation of Human Valvular Interstitial Cells, Pharmaceutics 2020, 12, 507; **IF** în 2020 6.321
3. Elena Valeria Fuior, Cristina Ana Mocanu, Mariana Deleanu, **Geanina Voicu**, Maria Anghelache, Daniela Rebleanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Evaluation of VCAM-1 Targeted Naringenin/Indocyanine Green-Loaded Lipid Nanoemulsions as Theranostic Nanoplatforms in Inflammation, Pharmaceutics, 2020, 12(11), pp. 1–21, 1066; **IF** în 2020 6.321
4. Elena Valeria Fuior, Mariana Deleanu, Cristina Ana Constantinescu, Daniela Rebleanu, **Geanina Voicu**, Maya Simionescu, Manuela Calin, Functional Role of VCAM-1 Targeted Flavonoid-Loaded Lipid Nanoemulsions in Reducing Endothelium Inflammation, Pharmaceutics, 2019, 11(8), 391; **IF** în 2019 4.773

BURSA OBȚINUTĂ PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL

Bursă de doctorat: Academia Română (SCOSAAR): 2017-2020

FINANȚAREA CERCETĂRILOR (GRANTURI):

1. **PN-II-RU-TE-2014-4-1837**

Proiect de cercetare pentru stimularea constituirii de tinere echipe de cercetare independente

Titlul proiectului: Nanoterapii țintite către endoteliu, proiectate pentru silențierea receptorului pentru produșii de glicare avansată (RAGE) în ateroscleroză (NANORAGE)

Perioada: 2015-2017

Director de proiect: Dr. Manuela Călin

2. **POC ID P_37_298; 115/13.09.2016**

Programul Operaţional Competitivitate, Axa prioritară 1: Cercetare, dezvoltare tehnologică şi inovare (CDI) în sprijinul competitivităţii economice şi dezvoltării afacerilor

Titlul proiectului: Terapii țintite pentru boala valvei aortice în diabet (THERAVALDIS)

Perioada: 2016 - 2020

Director de proiect: Dr. Agneta Simionescu

3. **13PCCDI/2018**

Proiecte complexe realizate în consorţii Cercetare Dezvoltare Inovare

Titlul proiectului: Terapii inteligente pentru boli non-comunicabile, bazate pe eliberarea controlată de compuși farmacologici din celule încapsulate după manipulare genetică sau bionanoparticule vectorizate (INTERA)

Perioada: 2018-2020

Director de proiect: Acad. Maya Simionescu

4. **PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0050**

Proiecte complexe de cercetare de frontieră

Titlul proiectului: Mimarea mecanismelor viului prin abordări ale chimiei supramoleculare, în cinci dimensiuni

Perioada: 2018-2022

Director de proiect: Dr. Aatto Laaksonen

5. **PN-II-P4-ID-PCE-2020-2465**

Proiecte de cercetare exploratorie

Titlul proiectului: Terapie direcționată bazată pe nanocarrieri biomimetici pentru rezoluția inflamației în ateroscleroză (NANORES)

Perioada: 2021-2023

Director de proiect: Dr. Manuela Călin.

Referințe:

1. Bossé, Y.; Miqdad, A.; Fournier, D.; Pépin, A.; Pibarot, P.; Mathieu, P., 2009. Refining Molecular Pathways Leading to Calcific Aortic Valve Stenosis by Studying Gene Expression Profile of Normal and Calcified Stenotic Human Aortic Valves, Circulation: Cardiovascular Genetics, 2(5), pp. 489–498
2. Calin, M.; Manduteanu, I., 2017. Emerging Nanocarriers-based Approaches to Diagnose and Red uce Vascular Inflammation in Atherosclerosis, Current Medicinal Chemistry, 24(6), pp. 550–567
3. de Almeida, R. F. M.; Borst, J.; Fedorov, A.; Prieto, M.; Visser, A. J. W. G., 2007. Complexity of Lipid Domains and Rafts in Giant Unilamellar Vesicles Revealed by Combining Imaging and Microscopic and Macroscopic Time-Resolved Fluorescence, Biophysical Journal, 93(2), pp. 539–553
4. Fischer, D.; Osburg, B.; Petersen, H.; Kissel, T.; Bickel, U., 2004. Effect of poly(ethylene imine) molecular weight and pegylation on organ distribution and pharmacokinetics of polyplexes with oligodeoxynucleotides in mice, Drug Metabolism and Disposition, 32(9), pp. 983–992
5. Hortells, L.; Sur, S.; st. Hilaire, C., 2018. Cell Phenotype Transitions in Cardiovascular Calcification, Frontiers in Cardiovascular Medicine, 5
6. http://www.romedic.ro/stenoza-aortica
7. Iung, B., 2003. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease, European Heart Journal, 24(13), pp. 1231–1243
8. Kanwar, A.; Thaden, J. J.; Nkomo, V. T., 2018. Management of Patients With Aortic Valve Stenosis, Mayo Clinic Proceedings, 93(4), pp. 488–508
9. Ko, Y. T.; Bickel, U., 2012. Liposome-Encapsulated Polyethylenimine/Oligonucleotide Polyplexes Prepared by Reverse-Phase Evaporation Technique, AAPS PharmSciTech, 13(2), pp. 373–378
10. Larrew, T.; Chow, J.; Schulte, J.; Simionescu, D.; Simionescu, A., 2013. The roles of various metabolic enzymes in diabetic cardiomyopathy—in vivo and in vitro approach, Cardiovascular Pathology, 22(3), pp. e48
11. Owens, D. S.; Katz, R.; Takasu, J.; Kronmal, R.; Budoff, M. J.; O'Brien, K. D., 2010. Incidence and Progression of Aortic Valve Calcium in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA), The American Journal of Cardiology, 105(5), pp. 701–708
12. Pawade, T. A.; Newby, D. E.; Dweck, M. R., 2015. Calcification in Aortic Stenosis, Journal of the American College of Cardiology, 66(5), pp. 561–577
13. Rutkovskiy, A.; Malashicheva, A.; Sullivan, G.; Bogdanova, M.; Kostareva, A.; Stensløkken, K.; Fiane, A.; Vaage, J., 2017. Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification, Journal of the American Heart Association, 6(9)
14. Simionescu, N.; Vasile, E.; Lupu, F.; Popescu, G., 1986. Prelesional events in atherogenesis: Accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the

arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit, American Journal of Pathology, 123(1)
15. Voicu, G.; Rebleanu, D.; Constantinescu, C. A.; Fuior, E. V.; Ciortan, L.; Droc, I.; Uritu, C. M.; Pinteala, M.; Manduteanu, I.; Simionescu, M.; Calin, M., 2020. Nano-Polyplexes Mediated Transfection of Runx2-shRNA Mitigates the Osteodifferentiation of Human Valvular Interstitial Cells, Pharmaceutics, 12(6), pp. 507
16. Voicu, G.; Rebleanu, D.; Mocanu, C. A.; Tanko, G.; Droc, I.; Uritu, C. M.; Pinteala, M.; Manduteanu, I.; Simionescu, M.; Calin, M., 2022. VCAM-1 Targeted Lipopolyplexes as Vehicles for Efficient Delivery of shRNA-Runx2 to Osteoblast-Differentiated Valvular Interstitial Cells; Implications in Calcific Valve Disease Treatment, International Journal of Molecular Sciences, 23, pp. 3824-3847